

Különböző oligomerizációs fokú β -amyloid
aggregátumok hatása a neuronális
excitabilitásra, az Alzheimer-kór, az
epilepszia és a gyulladásos reakciók komplex,
szinergikus mechanizmusa

Orbán Gergely

Témavezetők: Dr. Kékesi Adrienna Katalin
Dr. Juhász Gábor

ELTE-TTK Biológiai Intézet
Proteomikai Laboratórium

Biológia Doktori Iskola (Vezetője: Dr. Erdei Anna)
Molekuláris Sejt-, Fejlődés- és Neurobiológia Program (Vezetője: Dr. Sass Miklós)



Doktori értekezés, 2012

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés.....	4
I.1. Az Alzheimer-kór	6
I.1.1. Az Alzheimer-kór típusai	6
I.1.2. A betegség klinikai tünetei, kórlefolyása	7
I.1.3. A betegség neuropatológiája	8
I.1.4. A betegség genetikai háttere – ismert mutációk.....	9
I.2. A β-amyloid szerepe az Alzheimer-kór patomechanizmusában	11
I.3. Az Alzheimer-kór patomechanizmusának vizsgálatára használt emlősmodellek	18
I.3.1. Transzgénikus állatmodellek	18
I.3.1.1. <i>Tau-modellek</i>	18
I.3.1.2. <i>Az $A\beta$-tau tengely modellezése</i>	18
I.3.1.3. <i>Szekretáz modellek</i>	19
I.3.1.4. <i>ApoE (apolipoprotein E) modellek</i>	20
I.3.1.5. <i>Axonális transzport modellek</i>	20
I.3.1.6. <i>Transzgénikus patkány modellek</i>	20
I.3.2. Az Alzheimer-kór nem-transzgénikus állatmodellje, a modellel előállított főbb eredmények.....	21
I.3.2.1. <i>A β-amyloid peptid szolubilis formájának rövidtávú hatásai a memória folyamatokra</i>	22
I.3.2.2. <i>A β-amyloid peptid aggregált formájának hosszútávú hatásai a memória folyamatokra</i>	23
I.3.2.3. <i>A szinapszis, mint elsődleges célpont az Alzheimer-kórban – elektrofiziológiai vizsgálatok</i>	23
I.4. Excitabilitási viszonyok a thalamuszban, abszensz epilepsziában.....	26
I.6. Abszensz jellegű epilepszia az Alzheimer-kórban	28
I.7. A neuro-immunológiai folyamatok szerepe az epilepszia, a pszichiátriai betegségek és az Alzheimer-kór kialakulásában.....	29

II. Célkitűzéseink és a probléma kapcsán felmerülő kérdések.....	32
III. Anyagok és módszerek.....	34
III.1. Homogén aggregáltsági fokú oldatok előállítás.....	34
III.2. Az aggregációs fok utólagos ellenőrzése a kísérletben alkalmazott oldatokban.....	35
III.2.1. Atomi erő mikroszkópos mérések	35
III.2.2. Elektronmikroszkópos mérések	36
III.2.3. Thioflavin T mérések.....	36
III.3. A hippokampális piramis sejtek populációs tüzelésére gyakorolt hatás vizsgálata.....	37
III.3.1. Akut kísérletek	37
III.3.2. Krónikus kísérletek	39
III.4. A megnövekedett tónusos GABA_A gátlás hatásának farmakológiai vizsgálata <i>in vivo</i>.....	40
III.5. A perifériás lipopoliszacharid beadás kortikális és thalamikus hatásának proteomikai vizsgálata.....	42
III.5.1. A szövetminták előkészítése és a DIGE módszer.....	42
III.5.2. Adatelemzés, statisztika, preparatív 2D gél elektroforézis	43
III.5.3. LC/MS analízis és fehérje azonosítás.....	44
III.5.4. A proteomikai adatok interpretációs modellezése	45
IV. Eredmények.....	46
IV.1. Az Aβ oldatok <i>in vitro</i> karakterizálása és reprodukálhatósága	46
IV.2. Ellenőrzött méretösszetételű amyloid aggregátum oldatok hatása a patkány hippokampális populációs tüzelésére	49
IV.2.1. Altatott állatokon végzett kísérletek	49
IV.2.2. Éber állatokon végzett kísérletek.....	52
IV.3. A tónusos GABA_A gátlás szerepe az abszensz epilepsiában <i>in vivo</i>	54

IV.3.1. A GABA _A R δ specifikus agonistájának (THIP) hatása naív (Wistar) patkányban	54
IV.3.2. A GABA _A R δ expresszió csökkentésének hatása az abszensz epilepsziára GAERS patkányokban	55
IV.3.3. A háttér GABA szint növelésének hatása az abszensz epilepsziában Wistar patkányokban	57
IV.4. Az LPS megváltoztatta a cortex és a thalamusz proteomját	59
IV.4.1. A proteomikai mérések eredményei	59
IV.4.2. A proteomikai adatok interpretációs modellezése	63
V. Megvitatás	80
<p>A kísérleti eredmények megvitatását két alapvető szempont szerint végezzük el. Az egyik, hogy az egyes kísérleti blokkok eredményeit külön tekintjük át, hiszen tematikusan elég távol álló területekről van szó. Másrészt a kísérletek eredményei által generált és továbbkutatható problémákra koncentrálnunk. A megbeszélés végén egy általános konklúzió levonására is kísérletet teszünk.</p>	
V.1. A különböző aggregáltsági összetételű amyloid oldatok akut hatása a populációs tüzelésre	80
V.2. Kórosan megnövekedett tónusos GABA _A gátlás az abszensz epileptogenezis hátterében	83
V.3. Az Alzheimer-kór patomechanizmusának neuroimmunológiai folyamatai is facilitálják az abszensz epilepszia megjelenését	85
V.4. Általános konklúziók	86
VI. Köszönetnyilvánítás	87
VII. Irodalomjegyzék	88
VII. Rövidítésjegyzék	100
IX. Összefoglalás	104
X. Summary	105

I. Bevezetés

Az Alzheimer-kórban szenvedők száma a kor előrehaladtával 5 évente nagyjából duplázódik, jelenleg a neurodegeneratív betegségek nagyobb problémát jelentenek az Amerikai Egyesült Államokban, mint a daganatos megbetegedések. Becslések szerint a 2008-as évben 5.2 millió ember szenvedett Alzheimer-korban az Egyesült Államokban, ebből 5 millió 65 év feletti volt. Ez azt jelenti, hogy az idős korosztályban minden nyolcadik ember (a teljes idős populáció 13%-a) Alzheimer-kóros, a demensek száma a 90 évesek körében eléri a populáció 40%-át [1]. Az epidemiológiai adatokról bővebben az ADAMS (Aging, Demographics, and Memory Study) tanulmányban olvashatunk [2]. Az öregedő populációjú területeken (Európa, USA, Japán) különösen érezhetővé válik az időskori neurodegenerációs betegségek számának erős növekedése, így az egészségügyi ellátó rendszerek legnagyobb kihívásai közé tartozik. A neurodegeneratív betegségek témakörének súlyát jól jelzi erős reprezentáltsága az idegtudományi konferenciákon (Neuroscience, 2008. Washington: több mint 1500 neurodegeneratív betegséggel foglalkozó prezentáció).

A neurodegeneratív betegségek kezelésére az oki terápiái megoldás - a legtöbbször ismeretlen patomechanizmus miatt - máig megoldatlan. Jelenleg tüneti jellegű terápia áll rendelkezésünkre, amely a kórlefolyás lassításával, a tünetek enyhítésével, megjelenésük késleltetésével javíthatja az érintett emberek életminőségét, meghosszabbíthatja az emberhez méltó élet időtartamát, de nem nyújt megoldást a betegségek gyógyítására. Az ápolási ráfordítást illetően az Alzheimer-kórt tartják jelenleg a „legköltségesebb” neurodegeneratív betegségnek. Egy ígéretes gyógyszerjelölt kiválasztása, majd piacra juttatása bármely gyógyszerkutató cég számára a szakmai sikeren túl jelentős anyagi lehetőséget is rejt magában. Ennek megfelelően az Alzheimer-kór patomechanizmusának és lehetséges terápiájának kutatásában a verseny óriási. A fejlesztési munka intenzitása miatt szükség van a patomechanizmus minél pontosabb feltárására, minél korábbi, észlelhető elváltozások megismerésére. Alapvetően két megközelítési mód adott: a genetikusan β -amyloid (A β) túltermelő állatok vizsgálata illetve az A β beadása egészséges állatokba. Az egyik

lehetőség az A β beadási kísérletekre az amyloid aggregátumok neuronális működésre gyakorolt akut hatásainak vizsgálata, ami közelebb vihet az A β korai hatásainak feltáráshoz. Jelen dolgozatban összefoglalt munkánk egyfelől a különböző amyloid aggregátumok kísérletes alkalmazásának problematikájára fókuszálva keresi a korai amyloid hatásokat, másfelől az A β felszaporodás miatt kialakuló abszensz epilepsziás rohamok és agyi gyulladásai folyamatok vizsgálatával próbáltunk új aspektusból adatokat nyerni a Alzheimer-kór patomechanizmusával kapcsolatban.

Kísérleteink egyik kiinduló adata, hogy az amyloid aggregátumok akut hatásának vizsgálata során fény derült arra, hogy a korábbi feltételezésekkel szemben az oligomerek legkorábban jelentkező, excitabilitást befolyásoló hatása nem a szinaptikus transzmisszió megváltozásán keresztül valósul meg. Mindemellett számos friss adat tanúsága szerint az Alzheimer-kór kísérőjelenségeként abszensz jellegű epileptoid aktivitás, rohamok figyelhetők meg a betegség későbbi fázisában (összefoglaló: [3]). Ezen felül mind az Alzheimer-kór, mind az epilepsziás aktivitás regulációjában szerepet játszanak a gyulladásai citokinek.

Mivel az abszensz rohamok genezise tartós gátlás fokozódásra vezethető vissza és az A β bizonyos oligomerizációs fokú aggregátumainak hatása excitabilitás csökkenés, az abszensz epilepszia mechanizmusának vizsgálatára is kitértünk, különös tekintettel a thalamo-kortikális sejtek excitabilitás változása okainak tisztázására. Majd kerestük a közös mechanizmusokat az Alzheimer-kór, az epilepszia és a gyulladásai reakció között. A munka egy feltáró jellegű kezdeti lépésnek tekinthető, melyben több oladalról megközelítve próbáltunk új adatokat kapni az Alzheimer-kórral kapcsolatos mechanizmusokról. Munkánkat az indokolta, hogy az Alzheimer-kór kutatásában jelenleg széles körű útkeresés folyik, mivel a tradicionális kísérleti irányok elérték lehetőségeik maximumát. Ennek fényében eredményeink több új kérdést generáltak, mint amennyi megoldást adnak, ezért a klasszikus koherenciát nem mindig tudtuk érvényesíteni. Ezzel szemben minden esetben, kritikus és problémafelvető megvitátást választottunk.

I.1. Az Alzheimer-kór

I.1.1. Az Alzheimer-kór típusai

Hazánkban a 65 év feletti lakosság 12-15 százalékánál fordul elő valamilyen demencia, ami 250-300 ezer embert jelent. A demencia tünetegyüttese mögött leggyakrabban az Alzheimer-kór áll. 2000-es évi magyarországi adatok alapján a demens betegek 62 %-a (150-180 ezer ember) szenvedett úgynevezett vaszkuláris demenciával kevert Alzheimer betegségben [4]

Az Alzheimer-kórnak öt típusát különböztetjük meg a betegség kialakulása szerint:

1. Sporadikus, késői kialakulású változat (65 év feletti, leggyakoribb típus)
2. Családi halmozású, késői kialakulású változat
3. Családi halmozású, korai kialakulású változat
4. Down-szindrómával társult Alzheimer-kór
5. Egyéb neurodegeneratív betegségeket kísérő Alzheimer-kór [1].

Az Alzheimer-kór súlyos memóriazavarokkal, progresszíven hanyatló kognitív funkcióval járó, általában idős korban jelentkező betegség. A betegség a nevét Alois Alzheimerről (1864-1915) kapta, aki elsőként 1907-ben írta le az Auguste D. nevű 51 éves nőbetegén tapasztalt speciális demenciaformát. 1910-ben Kraepelin javasolta, hogy a demencia ezen formáját az orvosról nevezzék el. A betegség lefolyása általában bizonytalan kezdetű.

I.1.2. A betegség klinikai tünetei, kórlefolyása

Az első tünetek megjelenésétől négy fázisra különítik a betegség kórlefolyását:

1. Presymptomatikus demencia: Csökkent emlékezőképesség (epizodikusan előforduló emlékezet kihagyások), orientációs zavarok (idő- és térbeli). Szociális viselkedés zavarai, visszahúzódás, enerváltság, csökkent kreativitás.
2. Incipens demencia: Az epizodikus emlékezetkihagyások állandósulnak, súlyosbodnak az orientációs zavarok, gyakori szókeresés a beszédben. Fáradékonyság és depresszív tünetek jelentkeznek. Csökken az empátia, antiszociális jellegű viselkedés jelenik meg. Előfordulhatnak személycsere-téveszmék, konfúzus állapotok.
3. Középsúlyos demencia: Súlyos feledékenység. A mindennapi teendők ellátásának zavara, állandósuló szótévesztési és beszédértési zavarok, gondolatismétlések. A logikai és absztrakciós képesség minimálisra csökken. Erős szorongás, félelem a külvilágtól. Parkinsonizmus és myoclonusok jelentkezhetnek.
4. Súlyos demencia. A betegség végső szakasza. A beteg elveszti kapcsolatát a külvilággal, a múlt kódében él. A térbeli és időbeli tájékozódás képessége megszűnik. Nem ismer fel senkit, a beszédkésztség szinte megszűnik. Jellemzően hiányzik a vegetatív működések kontrollja. Ebben a fázisban a beteg már ágyhoz kötött, jelentős gondoskodásra, külső segítségre szorul. Jellemző tünet a jelentős testsúlycsökkenés [4].

A kórképtől függően, a kognitív hanyatlás melletti domináns tünetek alapján a klinikumban többféle altípust különítenek el.

Az Alzheimer-kór *kórlefolyását* tekintve progresszív betegség, de nem szükségszerűen lineáris. A betegség diagnosztától a halálig átlagosan 7-10 évig tart, amely időtartam gondoskodással, ápolással jelentősen elnyújtható. Hatásos gyógymód jelenleg nem ismert. Az enyhe tünetek megjelenése általában csak visszamenőleg állapítható meg. A betegség súlyosbodása az évek során fokozatosan történik. A kisebb

állapotrosszabbodásokat hosszabb-rövidebb „tisztá”, egyensúlyi időszak is követheti, mely után igen gyors és erőteljes, 1-2 hónap alatt lezajló romlások következnek be [4].

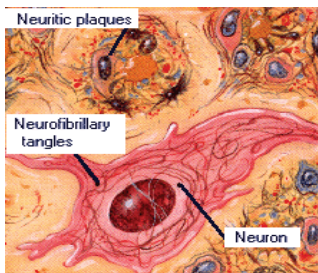
1.1.3. A betegség neuropatológiája

Az Alzheimer-kóros emberek agyán (*post mortem* vizsgálatok) a legszembetűnőbb makroszkopikus anatómiai változás a gyrusok keskenyedése, és a mély, széles sulcusok megjelenése (1. ábra).



1. ábra: **Egészséges és Alzheimer-kóros agyak összehasonlítása.** A baloldali képen egy nem Alzheimer-kórban elhunyt ember agyát látjuk. A jobb oldali, Alzheimer-kóros ember agyáról készített felvétellel összehasonlítva szembetűnőek a betegség által okozott anatómiai változások. Az agyvelő térfogatának nagymértékű csökkenése feltehetően a kór előrehaladtával fellépő nagymértékű sejtpusztulásnak tudható be.
(<http://www.alz.org/brain/09.asp>)

A beteg egyedek (emberek *post mortem* és modellállatok a kísérletek során) idegrendszerének szövettani vizsgálatakor kóros proteinaggregátumokat találunk. Intracellulárisan *tau* protein hiperfoszforilációját és polimerizációját, az extracelluláris térben *β -amyloid* protein aggregációját tapasztalhatjuk (2. ábra).



2. ábra: **A két legfontosabb szövettani jellegzetesség az Alzheimer-kóros agyban.** A β -amyloid szerkezetű aggregátumok az extracelluláris térben kiterjedt plakkokat, úgynevezett szenilis plakkokat képeznek a betegség előrehaladtával. A szenilis plakkok képződésével párhuzamosan intracelluláris elhelyezkedéssel a tau protein kóros polimerizációja figyelhető meg.
(<https://sharepoint.cisat.jmu.edu/isat/klevicca/Web/ISAT454/plak.gif>)

A betegség során kialakuló, *post mortem* vizsgálható számos hisztológiai eltérés egyike sem kizárólagos markere az Alzheimer-kórnak. Sok közülük megjelenhet a fiziológias öregedés során is, de sokkal kisebb gyakorisággal. Többük együttes fennállása adhat bizonyosságot a betegség meglétéről a *post mortem* diagnózis során. Ezek:

1. Számos szenilis plakkk jelenléte. 4-200 μm átmérőjű extracelluláris fehérjezárványok. Fő összetevőjük a β -amyloid [5]. Immunhisztokémiai módszerekkel több típusát különítik el. Legelterjedtebb ezek közül az úgynevezett neuritikus plakkk, melyben a centrális helyzetű β -amyloid mag köré disztrófiás neuritek rendeződnek, melyek PHF-tau (páros helikális filamentális tau) [6, 7], APP(amyloid prekursor protein) [8, 9], és ubiquitin [10] immunoreaktívak.
2. Neurofibrilláris kötegek (neurofibrillary tangle, NFT). Intracellulárisan megjelenő aggregátumok. A mikrotubulus asszociált tau protein hiperfoszforilált, aggregációra hajlamos formája a fő komponense. A hiperfoszforilált tau páros helikális filamenteket (PHF-tau) képez. Egy filament négy darab kb. 3 nm átmérőjű protofilamentumból épül fel [11-13].
3. Neuropil fonalak (neuropil threads). Rövid, csavart alakú ezüstkötő rostok a neuropilben [14, 15]. Általában dendritek, de lehetnek köztük axonok is [16]. Fő komponensük a PHF-tau, de neurofilamentre, ubiquitinre és acetilkolinészterázra is immunoreaktívak [17-19].

I.1.4. A betegség genetikai háttere – ismert mutációk

Az Alzheimer-kóros esetek túlnyomó többsége (kb. 90%) sporadikus, de a megbetegedések nagyjából 10%-a családi halmozódást mutat (familiáris Alzheimer-kór) [4]. A familiáris esetek hátterében több autoszómális domináns génmutációt írtak le, 100%-os penetranciával. Ezen génmutációk megismerése vezetett el a transzgénikus állatmodellek megalkotásának lehetőségéhez.

- Preszenilin-1 (PS1) mutációk. A kóros esetek kb. 2%-át teszik ki. Eddig kb. negyvenet írtak le [1, 20]. A PS1 génje a 14. kromoszómán található. Szolubilis formáját a γ -

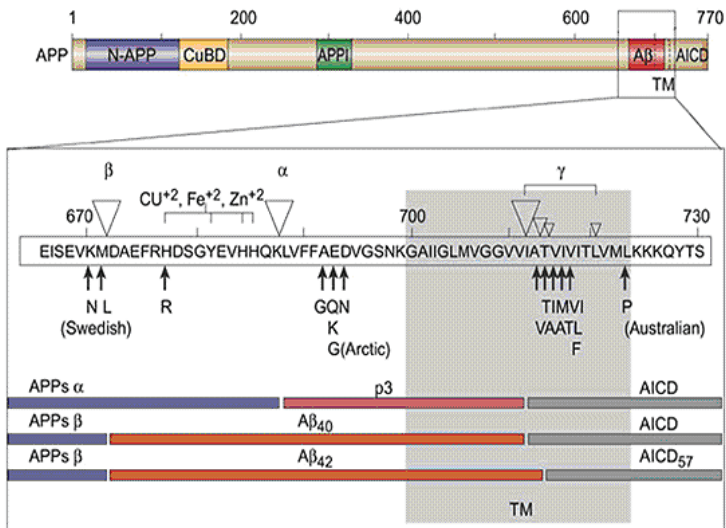
szekretáz proteázkomplex részeként azonosították [21, 22]. A PS1 mutációk fokozzák az $A\beta_{42/43}$ képződését.

- Preszenilin-2 (PS2) mutációk. A késői kialakulású familiáris esetekben jellemző. A PS2 génjének mutációi fokozott $A\beta_{42/43}$ termelődést eredményeznek [23, 24].
- APP mutációk. Az összes kóreset mintegy 0.1%-át teszik ki, többségük pontmutáció [1].

I.2. A β -amyloid szerepe az Alzheimer-kór patomechanizmusában

Éles vita tárgya, hogy melyik elváltozásé a fő szerep a betegség patomechanizmusában. A „baptisták” a β -amyloidot, míg a „tauisták” a hiperfoszforilált tau-t, azaz a neurofibrilláris kötegeket (NFT) tartják fontosabbnak [25, 26].

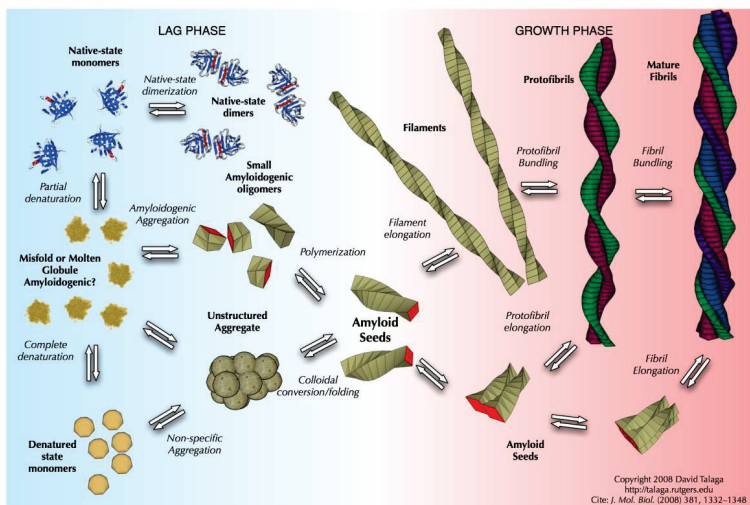
A β -amyloid az amyloid prekursor protein (APP) hibás feldolgozása, majd a lebonthatatlan illetve nehezen lebomló amyloid monomerek aggregációja során képződik. Az aggregáció egy soklépéses, lassú oligomerizációs folyamat, melynek eredményeként β -redős szerkezet alakul ki [27-29]. Az oligomerizáció folyamatát számos tényező (mint például koncentráció, molekuláris környezet) befolyásolja [30, 31]. Az APP egy transzmembrán glikoprotein, amely egy kisméretű intracelluláris és egy nagyméretű extracelluláris doménnel rendelkezik (3. ábra). Fiziológiás esetben az APP feldolgozásának első lépéseként az α -szekretáz enzimek lehasítják a fehérje extracelluláris szegmensét [25]. Az A β két típusa az A β _{39/40} és az A β _{42/43}. Az A β _{42/43} a γ -szekretáz és az úgynevezett β -szekretáz hatására keletkezik az APP-ből úgy, hogy 15 aminosavnyi rész a fehérje transzmembrán doménjéből, 28 aminosavnyi pedig az extracelluláris (N-terminális) részéből hasítódik ki. A β -szekretáz, más néven BACE (β -site APP-cleaving enzyme) egy transzmembrán aszpartil-proteáz, amelyet a neuronok nagy mennyiségben expresszálnak [32-34]. A γ -szekretáz-komplex részleteiben még nem pontosan ismert, feltehetően része a preszenilin-1 nevű fehérje [22]. Az A β _{42/43} erősen hidrofób, aggregációra hajlamos szerkezetű proteinfragmens. Az (A β _{42/43}) extracellulárisan aggregálódik szenilis plakkokká [1], ahová az endoszóma-lizoszóma rendszerben történő γ -szekretáz általi hasítás után excitózissal ürülő exoszómák révén juthat [35-37].



3. ábra: Az amyloid precursor protein doménszerkezete és feldolgozása. A nyilakkal jelölt helyeken ismert mutációk variánsokat tüntettek fel. (www.bath.ac.uk/bio-sci/images/profiles/Amyloid_precursor_Protein.png)

Kísérleteinkben a különböző méretű amyloid aggregátumok vizsgálatára koncentráltunk. A β -amyloid amyloid monomerekből képződő aggregátum, ami felhalmozódik a limbikus és asszociatív kérgi területeken az Alzheimer-kórban szenvedő betegek agyában [38, 39].

Ha az amyloid koncentráció egy adott szöveti kompartmentben meghalad egy bizonyos értéket, az aggregáció elkezdődik. Az aggregáció folyamatát vázlatosan a 4. ábra mutatja be.



4. ábra: Az amyloid aggregációjának folyamata. (Copyright David Talaga, Mol. Biol. (2008) 381, 1332-1345)

A β -amyloid, keletkezésekor rendkívül „ragadós” felszínnel rendelkezik, amelynek köszönhetően gyorsan oligomerizálódik és szinte bármilyen membránfehérjén képes megtapadni [40].

Irodalmi adatok alapján a β -amyloid aggregátum preferáltan kötődik olyan sejtek membránjához, melyek nagy méretűek, nagy felületű membránjukban sok proteint expresszálnak. Ilyen sejtek az emlősök agyában a preoptikus area nagy kolingerget sejtjei, a kérgi piramis sejtek, valamint a hippocampális piramis sejtek. Irodalmi adatok alapján az Alzheimer-kórban szenvedők agyában a β -amyloid lerakódások elsősorban a limbikus és asszociatív kérgi területeken jelennek meg [39, 41]. Ezeken a területeken tömeges neuronpusztulást okoznak azért, hogy mintegy lefestik a sejtek felszínén lévő molekuláris szerkezeteket, köztük a receptorokat és ioncsatornákat is. Korábban kimutatták, hogy az amyloid molekulából képződő nagy aggregátumok (β -amyloid plakkok) a kortikális és hippocampális neuronok számára *in vivo* és *in vitro*

körülmények között egyaránt toxikus hatásúak [42-44]. Feltételezések és szórványos kísérleti adatok szerint az amyloid monomerekből képződő kisméretű szolubilis oligomerek képesek bejutni a szinaptikus résekbe, és ott közvetlenül befolyásolhatják a szinapszisok működését [45]. Erre a nagyméretű aggregátumok és a β -amyloid szerkezeteket alkotó hosszú polimerek nem képesek, így lehetséges elektrofiziológiai hatásuk nagyobb valószínűséggel extraszinaptikus eredetű. A szinaptikus struktúrákban sokkal sűrűbben fordulnak elő sejtkapcsoló molekulák, így a szinapszis mintegy „gélszűrőként” méret szerint szelektál a különböző aggregátumok között. Így érthető, hogy a kis oligomerek szinapszisba való bejutása könnyű, ami erősen valószínűsíti az oligomerek szerepét a betegség korai szakaszában. Úgy gondoljuk, hogy a neuronok részleges vagy teljes kommunikációs izolációja egyrészt a sejthalál elindítója is lehet, másrészt a korai memória zavarok hátterében ez a mechanizmus is szerepet játszhat. A patogenezis szempontjából tehát hasonlóan fontos lehet a szinapszisokra gyakorolt hatása, a neuronok kapcsolatrendszerének patológiás megváltozása [45, 46], valamint a sejtműködést befolyásoló extraszinaptikus hatások [47]. Elmondható tehát, hogy a β -amyloid kötődése a sejtekhez függ a sejt fenotípustól. Ez annyira igaz, hogy sokáig azt hitték, hogy az Alzheimer-kór oka a cholinerg sejtek pusztulása, azonban ma már tudjuk, hogy ez csak egy részmechanizmus. Minden kétséget kizáróan igaz, hogy az amyloid aggregátumokra egyes fenotípusú sejtek sokkal érzékenyebbek, mint mások. A betegség speciális tüneteit, epizódikus kórlefolyását is ez okozhatja.

Vizsgálták a kisebb méretű oligomerek toxikusságát és több oldható, az aggregáció során keletkező (dimereknél nagyobb) oligomer intermedier variánst írtak le különböző kutatócsoportok. Soreghan és munkatársai megfigyelték, hogy β -amyloid 1-42 és annak rövidebb, 1-40-es variánsa „micellákat” formál oldatban [48]. Harper és munkatársai szferoidális struktúrákat azonosított atomi erő mikroszkópia (AFM) segítségével, és ezeket β -amyloid „protofibrillumoknak” nevezte el [49]. Végül egy harmadik kutatócsoport egy globuláris szerkezetű β -amyloid 1-42 intermediert azonosított, amelyet ADDL-nek ($A\beta$ -derived diffusible ligand) nevezett el [50]. Nem nyert egyértelmű bizonyítást, hogy a tünetek kialakításában a citotoxicitás az elsődleges tulajdonság. Ilyen oligomerek kimutatásra kerültek a hippocampusz CA1 (Cornu Ammonis-1)-es régiójában és az entorhinális kéregben humán agyakban az NFT-k és β -

amyloid plakkok távollétében is [51]. Tovább nehezíti a tisztánlátást, hogy gyenge a korreláció a humán *post mortem* mintákban található plakkok denzitása és az *ante mortem* tapasztalható kognitív zavarok között [52]. Emellett bizonyíthatóan találhatunk kiterjedt plakkokat elmezavarban nem szenvedő, egyéb okból elhunyt idősök kortexében is [53].

Mindezek alapján egyre jobban elfogadottak azok a nézetek, melyek szerint a kis, diffúzibilis oligomerek károsabbak a nagyméretű fibrilláris amyloid aggregátumoknál [45, 54-64].

A legszorosabb statisztikai összefüggést a szinapszisok száma és az elmezavar súlyossága között mutatták ki [65]. Mindezekon túl azt is kimutatták, hogy a szinapszisok számának csökkenése nem arányos a neuronok perikarionjainak pusztulásával, így az is felmerülhet, hogy a szinaptikus végződések elvesztése bekövetkezhet már a sejt halála előtt [66].

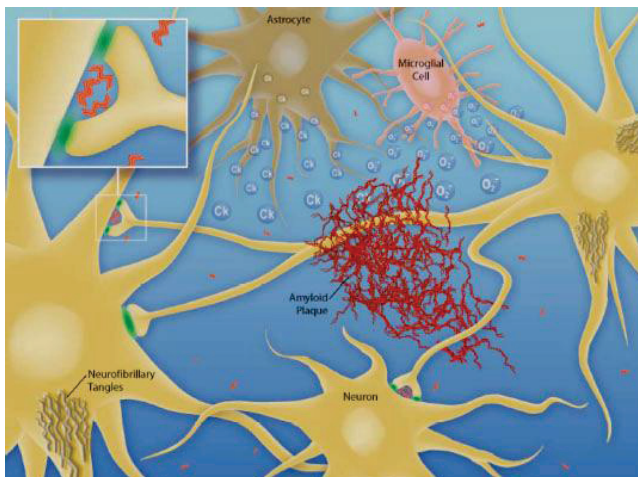
Mutáns humán Presenilin 1-et (PS-1) és Amyloid prekursor proteint (APP) expresszáló transzgenikus egerekben a neuronpusztulás csak a plakkok közvetlen közelében tapasztalható, távolabb nem, és ez csupán a kortex ~2 %-át érinti [67]. Feltehetően ilyen mérvű sejtpusztulás még nem jár funkcióvesztéssel.

Moechars és munkatársai APP transzgenikus egértörzsek vizsgálata során rendkívül izgalmas eredményekre jutottak, amelyek megkérdőjelezik az A β plakkok elsődleges szerepét a patomechanizmus korai szakaszában. Az állatok három hónapos koruktól már kognitív zavarokban szenvednek, azonban a kiterjedt plakkok csak tizenkét hónapos korukban jelennek meg az agykéregben, ugyanakkor elektrofiziológiai vizsgálatok tanúsága szerint az állatok csökkent LTP (long term potentiation, hosszútávú potenciáció) képességgel rendelkeznek [68].

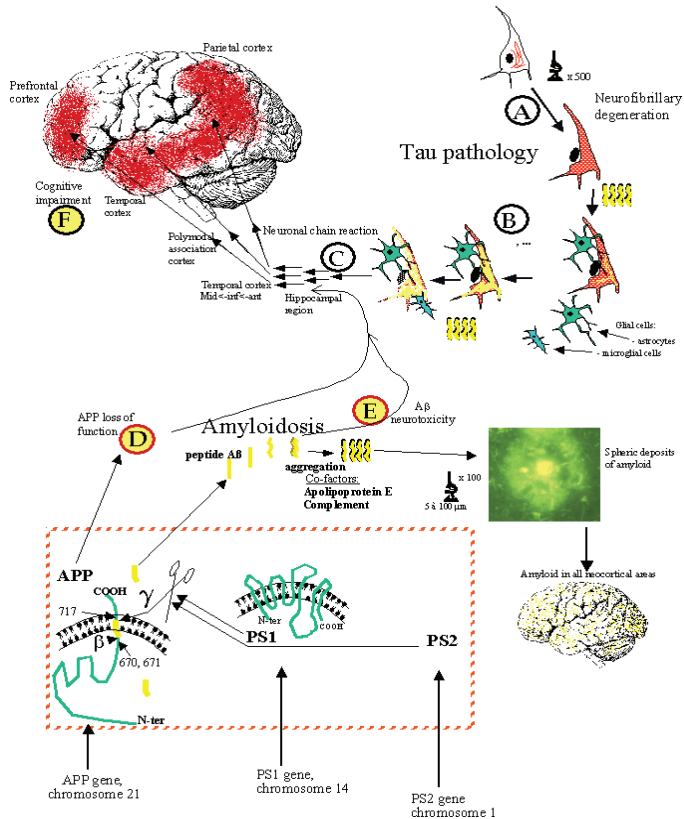
Mindezekből arra a következtetésre juthatunk, hogy a β -amyloid okozhat tüneteket a szinaptikus működés és a neuronális excitabilitás módosításán keresztül is. Emögött többféle patogenikus hatás állhat. Különböző β -amyloid aggregátum formák sokféle citotoxikus esemény kialakulásában vehetnek részt, beleértve a szinaptikus működés csökkent hatékonyságát, az axonlefutások „nyomvonalának” eltorzítását, a dendritarborizáció zsugorodását, mikroglia aktivációt, reaktív szuperoxid gyökök felszabadulását, gyulladásos folyamatok beindulását [69]. (5. ábra). A β -amyloid

szerepét a betegség kialakulásában az amyloid kaszkád hipotézis „frissített változata” foglalja össze (6. ábra). Walsh és Selkoe összefoglalójában számos spekulatív és kísérletes munkáról olvashatunk, amely próbálja feltárni, hogy melyik aggregációs formának milyen szerepe lehet a patomechanizmusban [70].

Az a tény, hogy a legkorábbi tünetek nem sejtdegenerációs folyamatok eredményei, felvetik a kis oligomerek egyéb, nem közvetlenül a toxicitással magyarázható hatásai vizsgálatának fontosságát. Mára, széles körben használt modell a β -amyloid aggregátumok LTP-re gyakorolt hatásának vizsgálata.



5. ábra: A β -amyloid neuropatológiai hatásának összefoglalása. Az ábra az axonlefutások - plakkok területén megfigyelhető - torzulását, az asztrociták plakkok körüli aktivációját - ami citokinek (Ck) felszabadulásához vezet -, mikroglia aktivációt - ami szuperoxid gyökök (O_2^-) felszabadulását okozza -, mutatja be. A szinaptikus hatékonyság alacsony aggregációs fokú, diffúzibilis oligomer β -amyloid által kiváltott zavarása, a normális transzmisszió (zöld felhő) csökkenése a szinaptikus résben jelenlevő, szinaptikus plazmamembránokkal kapcsolatba lépő dimer és trimer molekulák hatásának tudható be. Minden β -amyloid formát pirossal jelöltünk, az amyloid plakk fibrillumok egymásbafonódó tömegének és oldható β -amyloid dimerek és trimerek együttesének feleltethető meg. (A dimerek és trimerek „W” jelölése a β -redős szerkezetben gazdag struktúrájukra utal) (Walsh & Selkoe, *Neuron*, Vol. 44, 2004).



LogInserm Copyright

6.ábra: Az amyloid kaskád hipotézis. A: neurofibrilláris degeneráció. B: Tau patológia. Gyakran előfordul az öregedő agyban, különösen a hippocampális területen. Az elpusztuló sejtek maradványait a glia (astro- és mikroglia sejtek) távolítja el. C: A tau patológia a transzientorhinális kéregben kezdődik, majd az entorhinális kéregre, végül a hippocampusra terjed. D, E: Az APP diszfunkció, az Aβ sejtfunciókat zavaró, és neurotoxikus hatásának együttese kognitív zavarokat vált ki, valamint serkenti a neurofibrilláris degenerációt is. A kóros elváltozások kiterjednek az agykéreg egészére. F: A betegség során súlyosbodó kognitív zavarok jelentkeznek. Az agykéreg kiterjedt sorvadása végül a beteg halálához vezet. (LogInserm Copyright, www.alzheimer-adna.com/Images/PhysiopathGB.gif)

I.3. Az Alzheimer-kór patomechanizmusának vizsgálatára használt emlősmodellek

Az Alzheimer-kór patomechanizmusában résztvevő molekulák szerepének illetve patológiás hatásainak vizsgálatára számos állatmodell került kidolgozásra. Számos transzgénikus egértörzs, egy nemrég létrehozott transzgénikus patkánytörzs, valamint nem-transzgénikus, exogén amyloid aggregátumok bevitelével kiváltott hatások segítségével modellezték a patomechanizmus számos aspektusát. A modellek létrehozásában kulcsszerepet játszott a betegség molekuláris sejtbiológiai, valamint a családi halmozású (familiális) Alzheimer-kór vizsgálata során talált genetikai háttér megismerése.

I.3.1. Transzgénikus állatmodellek

I.3.1.1. Tau-modellek

Az első tau transzgénikus egérmodell a leghosszabb vad-típusú humán tau izoformát expresszált [71]. Ebben a modellben tau-protofilamentum és hiperfoszforiláció volt megfigyelhető.

Egy elegáns kísérletben kimutatásra került, hogy az rTG4510 tau transzgénikus egerekben a P301L tau expressziójának gátlása megakadályozza a viselkedési zavarok kialakulását, míg az NFT-k képződése folytatódik [72].

I.3.1.2. Az A β -tau tengely modellezése

Az Alzheimer-kór patomechanizmusának *in vivo* vizsgálatában az egyik legelterjedtebben használt eszköz a mutáns APP-t expresszáló transzgénikus egértörzs használata. Ezen egértörzsekben megfigyelhető a β -amyloid plakkok képződése, és a memóriakészség hibája egyaránt [73]. Az A β tau-patológiát indukálhat, igaz friss adatok szerint az endogén tau redukciója gátolja az A β toxicitást [74]. Az APP transzgénikus Tg2576 és a P301L tau transzgénikus JNPL3 törzs keresztezésekor, vagy

egy másik P30L tau transzgénikus törzs, a pR5 A β ₄₂ –vel történő intracerebrális kezelésekor megnövekedett tau foszforilációt, és a már jelen lévő NFT patológia erősebb kifejeződését figyelhetjük meg [75, 76]. Ehhez hasonlóan az NFT képződés fokozódásához vezet, ha a JNPL3 egerek agyába idős APP mutáns - APP23 egerek - agyi extraktumát juttatjuk, vagy a szóban forgó két törzset keresztezzük [77]. Ezt a hatást feltehetően a glikogén szintáz kináz 3 β (GSK3 β) mediálja [78], amely úgy tűnik, hogy az APP feldolgozásában is szabályozó szerepet tölt be [79]. A fent említett modelleken kívül kiemelt figyelmet érdemel a humán Alzheimer-kór patológiáját talán legjobban követő háromszoros transzgén modell [80]. Az APP^{swc} és a P301L tau PSEN1^{M146/-} háttérrel történő kombinációjából jött létre a 3xtg-AD egérmodell. Ebben a modellben Oddo és munkatársai a plakkok és NFT-k megjelenésén kívül intracelluláris elhelyezkedésű A β -t és szinaptikus diszfunkciót írtak le [80]. Mindezen kísérleti adatok fényében bizton állíthatjuk, hogy az A β és tau patológia szoros, szinergisztikus hatásával állunk szemben.

1.3.1.3. Szekretáz modellek

A β - és γ -szekretázok aktivitásának genetikai úton történő megzavarása során tapasztalt jelenségek hozzájárultak ezen enzimeknek az APP feldolgozásában, A β lerakódásában, valamint a memóriazavarok kialakulásában betöltött szerepének tisztázásához. A γ -szekretáz aktivitás megváltoztatása az M146L PS1 expresszióján keresztül egy APP transzgén háttérrel fokozta az A β ₄₂ képződést és lerakódást. Viselkedési deficitek és neuronvesztés is megfigyelhetők voltak, különös módon már az A β lerakódást megelőző időszakokban [81, 82]. Meglepő módon ez a jelenség még kifejezettebb volt az endogén PS1 kiütése után a PS1^{M146/-} „knock-in” egerekben, ami a vad típusú PS1 protektív hatására utal [83]. Az ADAM10 (a disintegrin and metalloproteinase 10) overexpressziója humán APP_[V171I] betöltött transzgénikus egerekben növelte az α -szekretáz által felszabadított szolubilis APP n-terminális domén (APPs_n) szekrécióját, csökkentette az A β képződését, javította a viselkedési deficiteket, és az LTP készséget, amely *in vivo* bizonyítékul szolgál arra, hogy az ADAM10 valójában az APP egy funkcionális α -szekretáza [84].

1.3.1.4. ApoE (apolipoprotein E) modellek

Az ApoE ϵ 4 allél egy fő rizikófaktor az Alzheimer-kórra. APP transzgénikus PDAPP (platelet-derived growth factor promoter-expressing APP) egerek ApoE $^{-/-}$ háttérrel való keresztezése erősen csökkenti az agyi A β szintjét és lerakódását [85], míg az ApoE4 lentivirális bevitelének serkenti az A β képződést [86].

1.3.1.5. Axonális transzport modellek

Az axonális transzportot a mikrotubulusok mentén a kinezin és dynein proteinek mediálják [87]. Az axonális transzport károsodása az Alzheimer-kór patomechanizmusának egy lehetséges alkotóeleme, amely megfigyelhető volt az APP és a tau transzgénikus egerekben is [88-90]. Ezen felül a kinezin könnyű láncok mennyiségének csökkenése a kinezin könnyű lánc heterozigóta (Klc $^{+/-}$) és APP transzgénikus egerek keresztezésével létrehozott törzsből fokozta az axonális defektusokat és az amyloidogén APP feldolgozást [90]. Mind a tau, mind az APP proteinek szerepéhez juthatnak az axonális transzport folyamatában: a tau szabályozza a motor-proteinek mikrotubulusokhoz kötését, az APP pedig a „szállítmány” motorproteinekhez történő kötését [91-93]. Az, hogy pontosan milyen mértékű a tau szerepe az axonális transzport károsításában, még nem teljesen tisztázott. Az Alzheimer-kórban a tau hiperfoszforilált, ami csökkenti a mikrotubulusokhoz való kötődését [94]. Felmerült a tau közvetlen interakciója a motorproteinnel, amely szintén az axonális transzport megváltozásához vezet [95].

1.3.1.6. Transzgénikus patkány modellek

A transzgénikus egerekkel párhuzamosan több transzgénikus patkánymodell került kifejlesztésre, tekintettel arra, hogy a patkányok jobb rácsálómodellek a viselkedésneurobiológiai tesztek, kanülbeültetés, likvor mintavétel, elektrofiziológia, képalkotási módszerek, és sejt-alapú átültetési manipulációk céljára [96]. Jelen tanulmány megírásáig négy transzgénikus patkánytörzs látott napvilágot:

1. APP (K670N/M671L és V717F), valamint PS1 (M146V) mutáció. 9 hónapos korban megjelenő amyloid lerakódás. A plakkok lerakódása előtt, 7 hónapos kortól LTP deficit, térbeli tanulás és memória sérülése szintén ettől az életkortól, valamint a későbbi életszakaszokban is, amikor a plakk képződés jellemző. Az említett funkciók károsodása erős korrelációt mutat a hippocampusban fellelhető teljes $A\beta_{1-42}$ mennyiséggel [97].
2. K670N/M671L (svéd) mutációt hordozó humán APP-t expresszáló patkány. Ez a törzs kis mennyiségű humán APP-t expresszál, amyloid patológia nem figyelhető meg rajta. Érdekessége, hogy ennek ellenére rosszabbul teljesít a Morris vizilabirintus tesztekben, mint a megfelelő életkorú kontroll [98].
3. Intracelluláris $A\beta$ -t felhalmozó patkánytörzs, amelyben nem alakul ki extracelluláris lerakódás [99].
4. Újabb, szintén a svéd mutációt hordozó humán APP-t expresszáló patkánytörzs, melyben enyhe extracelluláris $A\beta$ immunopozitivitás figyelhető meg, de 22 hónapos korra se jelennek meg az állatokban kompakt, kifejtett amyloid plakkok [100].

Mindezek alapján elmondható, hogy a rendelkezésre álló transzgénikus patkánytörzsek közül az első, Flood és munkatársai által kifejlesztett törzs modellezi leghatékonyabban a humán Alzheimer-kór patomechanizmusát.

I.3.2. Az Alzheimer-kór nem-transzgénikus állatmodellje, a modellel előállított főbb eredmények

A fent részletezett transzgénikus modellek mellett az Alzheimer-kór patomechanizmusának illetve az $A\beta$ szerepének vizsgálatára gyakran alkalmazott módszer a vad típusú állatok kívülről bevitt $A\beta$ -val történő kezelése (összefoglaló: [58]). Ez a módszer számos, a transzgénikus modellekben nem tanulmányozható új eredményhez vezetett, mivel lehetőséget nyújt a szolubilis és inszolubilis amyloid aggregátumok hatásainak összehasonlítására, valamint a különböző aggregációs fokú amyloid molekulák hatásának elkülönülő vizsgálatára. Tekintettel arra, hogy a mi kísérleteink is ezen a módszeren alapulnak, jelen fejezetben a szóbanforgó modell

segítségével kapott korábbi eredményekre részletesebben térek ki, mint a transzgénikus állatmodellek esetén.

A szolubilisabb ($A\beta_{1-40}$ vagy rövidebb) molekulák a hosszabb, fibrillumképzésre hajlamosabb ($A\beta_{1-42/3}$) molekulákhoz képest gyorsan kiürülnek az agyból fagocitózis és proteáz aktivitás útján [101], vagy más fiziológiai mechanizmus segítségével az agyból a perifériára kerülnek (összefoglaló: [102]).

1.3.2.1. A β -amyloid peptid szolubilis formájának rövidtávú hatásai a memóriafolyamatokra

Flood és mtsai bemutatták, hogy az $A\beta$ peptid néhány szolubilis formájának ($A\beta_{1-28}$, $A\beta_{12-28}$, $A\beta_{18-28}$ és $A\beta_{12-20}$) agykamrai bejuttatása rövidtávú amnéziához vezet [103]. Az $A\beta$ és a memóriafolyamatok kapcsolatának újabb aspektusát derítette fel McDonald és munkatársainak valamint Maurice és munkatársainak kísérletsorozata. Közvetlenül a kondicionálás előtt, vagy után történő $A\beta_{1-40}$ vagy $A\beta_{25-35}$ injekció a térbeli tanulás deficitjét okozta [104], míg a tesztek előtti infúzió hatástalannak bizonyult egerek esetében [105]. Minden tanulmány egyöntetűen arra mutat, hogy az $A\beta$ peptid kezelésnek rácsálókban nincs hatása a már megtanult feladatok kivitelezésére [103-105]. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a peptideknek specifikus hatása van a memória konszolidációra és az aktív memóriára (working memory) anélkül, hogy általánosan károsítanák a tárolt információ felidézését. Természetesen ezeknek az eredményeknek az átgondolásakor figyelembe kell vennünk, hogy az $A\beta$ memóriára gyakorolt hatása attól is függ, hogy milyen struktúrát kezeltünk vele, tekintettel arra, hogy a különböző struktúráknak más-más szerepe lehet a tesztelt memóriafolyamatokban. Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a hippocampusz integritása nem feltétlenül szükséges a radiális kar labirintus feladat teljesítéséhez, ha a tesztet késleltetés nélkül végezzük el egy jól kondicionált patkányon, ugyanakkor a régebben megtanult, már „elfelejtett” emlényomok újbóli aktív memóriába történő felidezésének feltétele a hippocampusz integritása [106, 107].

1.3.2.2. A β -amyloid peptid aggregált formájának hosszútávú hatásai a memóriafolyamatokra

A korábban tárgyalt, szolubilis A β által indukált rövidtávú hatásokkal ellentétben úgy tűnik, hogy a hosszútávú elváltozások inkább az aggregált formáknak köszönhetők. Az injekció után 14 nappal vizsgált memóriadeficitek kifejezettebbek voltak aggregált A β_{25-35} agykamrai beinjektálása esetén, mint ugyanezen peptid szolubilis formájának alkalmazásakor [108]. Más tanulmányok az aggregált A β_{1-42} intrahippokampális bejuttatásának hatását hosszabbtávú memóriadeficit kimutatásával hozzák összefüggésbe. O'Hare és munkatársai a két-kar operáns kondicionálás paradigmában mutattak ki sérült memóriakészséget a kezelést követő 50. naptól [109]. A β_{1-42} három napon át tartó agykamrai infúziója során az infúzió utáni 20. naptól a 80. napig tartó progresszív tanulási zavar figyelhető meg [110].

1.3.2.3. A szinapszis, mint elsődleges célpont az Alzheimer-kórban – elektrofiziológiai vizsgálatok

Az irodalmi adatok tanúsága szerint bizonyítást nyert, hogy az agykamrába injektált humán β -amyloid oligomer oldat gátolja a hippocampusban az LTP fenntartását patkányokban *in vivo*. Ugyanezen kísérleteik alapján Walsh és munkatársai kizárhatónak tekintik, hogy az LTP *in vivo* blokkolásában bármilyen szerepet játszanának a monomer, vagy természetes fibrilláris formájukban jelen lévő humán β -amyloid formák [64]. Engström és munkatársai felvetették annak a lehetőségét, miszerint a β -amyloid kalcium-permeabilis pórusok kialakulását okozhatja a sejtmembránon [111], valamint blokkolhatja a gyorsan inaktiválódó kálium csatornák működését *in vitro* [112]. Ráadásul az L-típusú kalcium csatorna okozta kalciumáram is növekedett a β -amyloid mitogén aktiválta protein kinázon (MAPK) keresztül kifejtett hatására [113, 114]. Az intracelluláris kalcium homeosztázis felborulása feltehetően kulcsszerepet játszik az LTP zavarainak kialakításában, de ezen kívül befolyással lehet a neuronális excitabilitásra is. Kimutatásra került továbbá, hogy a kicsiny, protofibrilláris állapotú β -amyloid az NMDA (N-metil-D-aszpartát) receptorcsaládhoz kötődik

preferáltan, míg a nagyobb méretű fibrillumok szelektíven modulálják a nem-NMDA receptorok működését. Ezek a közlésre került adatok alátámasztják továbbá azt a felvetést, hogy a β -amyloid pre-fibrilláris oligomer formái fontos szerepet játszanak a korai memória- és kognitív zavarok manifesztációjában az Alzheimer-kór során [115]. Folytonos, 10-11 napon át tartó $A\beta_{1-40}$ (300pmol naponta) kezelés, vagy egyszeri nagy dózisu (400 μ g) $A\beta_{25-35}$ kezelés során a hippocampusz CA1 régiójában mérhető populációs tüzelés LTP-jének zavarát mutatták ki *in vitro* mérésekben [116]. Érdekes adat, hogy ugyanezen kezelési paradigmákkal a CA1 régióban a piramissejtek GABA-erg (γ -amino vajsav) válaszanak vizsgálata során a piramissejtek hosszútávú heteroszínaptikus modifikációjának sérülését tapasztalták [117]. Megjegyzendő, hogy míg *in vivo* a fenti hatásokat tapasztalták, a β -amyloid *in vitro* (szövetfürdőbe való juttatása után közvetlenül végzett) vizsgálata során az LTP serkentését írták le, melyet az NMDA receptorok megnövekedett működésével magyaráztak [118, 119]. Nemrég közzölt kísérleti adatok felvetik a lehetőségét, hogy a memóriaműködés zavarát okozó legfőbb aggregátum forma a dodekamer (56 kDa) amyloid aggregátum, amely a Tg2576 transzgénikus egerekben 6 hónapos korban jelenik meg. Ugyanezen tanulmányban bemutatják a szerzők, hogy a kor előrehaladta kis elemszámú $A\beta$ szerkezetek nagyobb molekula-tömegű aggregátumokká történő átalakulását vonja maga után. A dodekamer (56 kDa) forma megjelenése erősen korrelál a térbeli tanulás és memória sérülésével [120]. Az irodalmi adatok ellentmondásosak az *in vivo* és *in vitro* eredmények szempontjából, aminek egyik lehetséges magyarázata, hogy a kísérletek során nem voltak kellő tekintettel a használt amyloid oldatok aggregációs profiljára. Felmerül tehát, hogy az ellentmondó adatok mögött az eltérő, rosszul definiált aggregációs profilú oldatok különböző hatásai állnak. Kísérleti munkánk egyik fontos feladata volt, hogy a fent említett problémát elkerülendő az *in vivo* vizsgálatokban lehetőleg legpontosabban karakterizált aggregátumokat alkalmazzunk. A fent említett LTP-kísérletek elvégzésekor a kutatók a mező-excitatórikus poszt-szinaptikus potenciálokat (fEPSP-fieldEPSP) többször ismételt tetanizálás hatására létrejövő, hosszútávon fennmaradó serkentésének ismert jelenségét használták modellként. Ez a modell alkalmas a szinaptikus plaszticitásra, szinapszisok állapotára gyakorolt hatások vizsgálatára, de nem terjed ki egyéb, a plaszticitástól eltérő, akár extraszinaptikus eredetű hatás keresésére, az excitabilitás feltételezhető befolyásoltságának tisztázására.

Mindezen előzményeken elgondolkodva felmerült egy olyan kísérlet kivitelezése, melyben a vizsgált jelenség jól korreláltatható a szinaptikus működés hatékonyságával, de emellett informál a piramissejtek excitabilitásáról, tüzelési hatékonyságáról is. A perforáns pálya ingerlésével kiváltott hippocampális kiváltott válasz jól tükrözi a populációs excitatórikus poszt-szinaptikus potenciálokat (pEPSP) és a populációs akciós potenciálokat (populációs túske, pSpike) is [121]. Így esett választásunk a patkány hippocampuszban a perforáns pálya ingerlését követően regisztrálható kiváltott válasz vizsgálatára.

I.4. Excitabilitási viszonyok a thalamuszban, abszensz epilepsziában

Az Alzheimer- kórban leírtak abszensz epilepsziás rohamokhoz hasonló rohamgenézist. Az abszensz epilepszia modellek thalamo-kortikális rohamokat generáló patkánytörzsek. A rohamgenézis több szempontból ismeretlen mechanizmusú és ezért a közös regulatórikus komponensek megismerése előtt több alapvető kérdést is vizsgálni kell. A tipikus abszensz rohamok különböző idiopátiás generalizált epilepsziákra jellemzőek, az EEG-n (elektro enkefalogram) bilaterális, szinkronizált túske-hullám kisülések (spike-and-wave discharge, SWD) formájában jelennek meg a cselekvés leállása (behavioural arrest) kíséretében. Összefoglaló: [122] (Crunelli and Leresche, 2002). Az ismert, hogy az abszensz rohamok a thalamo-kortikális hálózatokból indulnak ki [123-125], de a közreműködő celluláris mechanizmusok tisztázatlanok. A legelfogadottabb hipotézis a GABA-erg gátlás meghibásodása [126, 127], GABA_A receptor (GABA_AR) alegységek mutációi is azonosításra kerültek tipikus abszensz rohamokban szenvedő humán páciensek körében, jöllehet egy komplex fenotípus részeként [128-130]. Bár a fent említett mutációk közül jónéhány befolyásolja a GABA_AR receptor funkciót heterológ expressziós rendszerekben [131], csak enyhe változásokat mutattak ki a GABA_AR mediálta gátlás mértékében a thalamo-kortikális rendszerben a spontán SWD-ket produkáló állatmodellekben [123, 132, 133]. Ezen kívül, a szisztémásan, vagy intra-thalamikusan bejuttatott, GABA-erg gátlást serkentő hatóanyagok, beleértve az anti-epileptikumokat, mint például a vigabatrin és a tiagabin, fokozzák a rohamok számát abszensz epilepsziás betegekben és állatokban egyaránt [134-138]. Így tehát feltételezhető, hogy az abszensz epilepszia esetében a thalamuszban inkább megnövekedett, mintsem csökkent GABA_AR gátlás állhat az abszensz rohamok kialakulásának hátterében.

A GABA_A receptorok aktivációja kétféle gátló hatás kifejeződéséhez vezet: a klasszikus “fázisos” gátlás hátterében a szinaptikus GABA_A receptorok (sGABA_AR) átmeneti aktiválása áll, amely gátló poszt-szinaptikus áramok (IPSC) megjelenéséhez vezet, míg a “tónusos” gátlás hátterében a peri- és/vagy extraszinaptikus GABA_A

receptorok aktivációja a felelős (eGABA_AR), amely a háttér, vagy környezeti GABA által létrehozott tartós gátló áram [139, 140]. A „tónusos” gátlás a thalamusz ventrobazális magcsoportjában (VB) túlnyomó részt a δ alegység tartalmú GABA_A receptorokon (GABA_AR δ) keresztül valósul meg [141]. Tekintettel arra, hogy a thalamo-kortikális sejtekben, amelyek főszerepet játszanak az SWD-k generálásában, a GABA_A receptorok mediálta gátló hatások >90%-a “tónusos” [141-144], megvizsgáltuk, hogy vajon milyen szerephez jut a tónikus gátlás az abszensz epileptogenezisben. Kísérleti adataink bizonyítják, hogy a megnövekedett tónusos GABA_A gátlás általános jelenség mind a genetikai, mind a farmakológiai abszensz epilepszia modellekben, szükséges és elegendő feltétel az SWD-k megjelenéséhez [145].

Az abszensz epilepszia során megfigyelhető excitabilitás csökkenés (tónusos GABA_A gátlás) a thalamo-kortikális (TC) sejtekben jól korrelál a nagy β -amyloid oligomerek nem-szinaptikus eredetű excitabilitás csökkentő hatásával [47].

I.6. Abszensz jellegű epilepszia az Alzheimer-kórban

A spontán rohamok előfordulása Alzheimer-kórban szignifikánsan magasabb, mint az azonos életkorú kontroll csoportokban [146-150]. A kauzális kapcsolatot az akkumuláció és az epileptogenezis között támogatta Palop és munkatársainak 2007-ben megjelent munkája, amelyben kortikális és hippocampális eredetű nem-konvulzív rohamokat írnak le három különböző APP transzgénikus egértörzsben [151]. Ezeket a felfedezéseket kiegészíti Minkeviciene és munkatársainak munkája, melyben demonstrálják, hogy mind az APdE9 transzgénikus törzsben, mind pedig az exogén eredetű β -amyloid aggregátumok hatására megnövekszik a 2/3 agykérgi réteg piramissejtjeinek excitabilitása. Ugyanezen munkában bemutatásra kerül, hogy az excitabilitás változásért nem az inszolubilis amyloid plakkok, hanem a szolubilis aggregátumok felelősek, valamint, hogy az APdE9 transzgénikus egértörzsben spontán rohamok fedezhetők fel az EEG felvételeken, melyeket az állat immobilizációja kísér [152].

I.7. A neuro-immunológiai folyamatok szerepe az epilepszia, a pszichiátriai betegségek és az Alzheimer-kór kialakulásában

Az emlős szervezetek integritásának megőrzésében két szabályozó nagy rendszeré a főszerep: az immunrendszeré és az idegrendszeré. Összefoglaló: [153]. Számos bizonyíték támasztja alá azt a megfigyelést, hogy e két rendszer elválasztása mesterséges. Ismert, hogy a gyulladásai citokinek közül az interleukin 1 β (IL1 β) jelentősen befolyásolja az epilepszia genezist abszence epilepszia modellekben [154]. Ismert továbbá, hogy a neuro-immun együttműködés hatására láz alakulhat ki a citokinek termoregulátoros neuronokra gyakorolt hatásaként [155], és a citokinek számos epilepszia modellben fokozzák az epileptoid aktivitást. A gyulladásai citokinek egyaránt szerepet játszanak az epilepszia [156], a pszichiátriai betegségek [157] és az Alzheimer-kór [158, 159] patogenezisében, gyulladásai citokinek szabadulnak fel az amyloid plakkok környezetében. Az általános betegség érzet [160] és a vele járó megváltozott érzékelés vagy fokozott aluszékonyág [161] mind alátámasztják azt a megfigyelést, hogy a gyulladásai reakciók az agyműködés bonyolult és hosszantartó változásaihoz vezethetnek. Mindezek alapján az Alzheimer kór, az epilepszia és az inflammáció összefüggéseiből egy új megközelítés alakulhat ki patomechanizmusuk vonatkozásában.

A bakteriális lipopoliszacharid (LPS) felelős a gram negatív fertőzéseket kísérő központi és perifériás gyulladásai reakciókért, bár a perifériás LPS központi idegrendszerre gyakorolt hatásának mechanizmusa nem teljesen tisztázott. Korábbi munkánk során fény derült arra, hogy a genetikusan epilepsziás WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo/Rijswijk) patkány törzsben [162, 163] a perifériás LPS kezelés hatására fokozódott a roham aktivitás [154]. A gyulladásai folyamatok és az epileptogenezis viszonya a neuro-immunológia széles körben kutatott területe, ezért a perifériás LPS injekció hatására bekövetkező excitabilitás változás mechanizmusának megértése fontos feladat.

Ismert, hogy az egészséges felnőtt agyban finom egyensúly áll fenn a serkentő és gátló transzmitterek és a gyulladásserkentő és gátló citokinek között [160]. Ha felborul az egyensúly az endogén citokin felszabadulásában, az hatással van az alvás-ébrenléti ciklusra [164, 165] és megváltoztatja az egyi elektromos aktivitást is [166], például a gyulladásserkentő citokinek szintjének növekedése megnöveli az epilepsziás rohamok megjelenésének valószínűségét [166-168]. Jónéhány epilepszia szindróma esetében írták le a szérum citokin szintjének poszt-iktális növekedését [169], és bizonyítást nyert, hogy a poszt-iktális gyulladásserkentő citokineket az agyban gliális sejtek szintetizálják [168, 170, 171].

Mint ismeretes, az LPS a 4-es típusú Toll-szerű receptorokhoz (Toll-like receptor 4, TLR4) kötődik, és több gén aktivációján keresztül széleskörű változásokat indukál a proteomban, a vérben és az agyban is [172-174]. A toll-ceramid útvonal a kappa B nukleáris faktor (Nuclear factor-kappa B, NFkB) elnevezésű transzkripciósz faktoron végződik, amely több száz gén transzkripciójáért felelős [174-176]. A TLR4 aktivációja citokin felszabadulást vált ki, beleértve az interleukin 1 β felszabadulását, tehát a toll-ceramid útvonal interferál az interleukin receptor aktiválta ceramid útvonal válasszal [173, 177]. A neuronok és asztrociták kifejezik az IL1 β receptorokat (IL1R), melyek egy szintén az NFkB-n végződő szignalizációs útvonal aktivációjáért felelősek [173], így tehát mind az LPS közvetlen - TLR4-en keresztül -, mind pedig a közvetett, IL1 β felszabadulás által közvetített hatása az NFkB aktivációjához vezet: következésképpen a perifériás LPS injekció hatására lavinászerű génátírás indulhat meg az agyban [160, 174].

Jelen kísérleteinkben a perifériás LPS injekció hatására létrejövő agyi proteinek koncentráció változását vizsgáltuk WAG/Rij patkányokban, az eredményeket pedig *in silico* tovább elemeztük irodalmi adatokon alapuló proteinhálózat modellezéssel. Tekintettel arra, hogy a tüske-hullám kisülések (spike-wave discharge, SWD) a thalamo-kortikális hálózatban keletkeznek [178], a vizsgálatok során a fronto-pariétális kéreg és a thalamusz proteomját elemeztük. A kortikális és thalamikus proteom LPS kezelésre bekövetkező változását fluoreszcens két-dimenziós differenciál gél elektroforézissel (2D-DIGE) tanulmányoztuk. Az eredmények további elemzését Ariadne Genomics Pathway Studio[®] szoftverrel végeztük.

Mindkét struktúra esetén találtunk változásokat a proteomban a kezelés hatására, és felderítettük, hogy a thalamusz átfogóbb változásokkal reagált, mint a kéreg.

II. Célkitűzéseink és a probléma kapcsán

felmerülő kérdések

Az amyloid oldatokkal végzett kísérletek során ezidáig nem volt elterjedt a különböző aggregátságú molekulák elkülönített vizsgálata. Az aggregációs fok kézrentartása nehezen megoldható feladat, tekintettel arra, hogy egy soklépéses egyensúlyi reakcióról van szó. Biofizikusok és biokémikusok régóta foglalkoznak a β -amyloid képződés, és az amyloid aggregáció termodinamikájával *in vitro* [179]. Munkáik eredményei azonban még nem mentek át a tudományos köztudatba annyira, hogy fiziológiai kísérletek során is széleskörben alkalmazzák őket.

Ismert tény, hogy emlőskön végzett kísérletekben a humán β -amyloid aspecifikusan kötődik a sejtek membránproteinjeihez [40]. Széleskörűen elfogadott, és számos kísérleti eredménnyel alátámasztott nézetek szerint a patomechanizmusban a főszerep nem az inszolubilis, fibrilláris amyloid formaké, hanem a mozgékonyabb, kisebb aggregátumoké, oligomereké [45, 54-56, 59-64]. Arról viszont meglehetősen kevés információ áll rendelkezésre, hogy a különböző aggregátumoknak mi lehet a patomechanizmusban betöltött szerepe, van-e a hosszabb távon jelentkező neurotoxikus hatáson, és a manapság egyre gyakrabban emlegetett hosszútávú potenciáció képességét (LTP) befolyásoló hatáson kívül egyéb, közvetlenül a vizsgált folyamatokban fellelhető gyors, korai hatásuk.

A bevezetőben említett friss, az Alzheimer-kór és az abszensz epilepszia között szoros kapcsolatot feltételező irodalmi adatok, valamint az amyloid oligomerekkel végzett kísérleteink eredményei rávilágítottak, hogy a két betegség patomechanizmusának párhuzamos vizsgálata célravezető lehet a ko-morbiditás hátterének megértése szempontjából. Ezért munkánk második felében az abszensz epilepszia patomechanizmusának vizsgálatára koncentráltunk.

Célkitűzéseink összefoglalva:

- 1. A biofizikai kutatások eredményeit és eszközeit felhasználva lehetőség szerint minél homogénebb aggregáltságú oldatokat alkalmazzunk, valamint a kísérletek során alkalmazott oldatok aggregátum összetételét minél pontosabban meghatározzuk.*
- 2. A különböző aggregáltsági fokú oldatok hatását összehasonlítsuk.*
- 3. Az irodalomból ismert, szinaptikus plaszticitási folyamatokra (LTP/LTD) gyakorolt hatásokat kiegészítendő olyan modellt felállítása, amely tisztázza, hogy milyen egyéb, excitabilitást befolyásoló változásokat okozhatnak a különböző amyloid aggregátumok.*
- 4. Az abszensz epileptogenezis molekuláris hátterének vizsgálata, különös tekintettel a thalamo-kortikális sejtek excitabilitás-változásának hátterére és a gyulladási folyamatok szerepére.*

III. Anyagok és módszerek

III.1. Homogén aggregátsági fokú oldatok előállítása

A kísérletekhez a β -amyloid peptid 42 aminosav hosszúságú formáját használtuk ($A\beta_{1-42}$), melyet Prof. Penke Botond (Szeged) együttműködésünk keretében bocsátott rendelkezésünkre. A szilárd hordozón végzett peptidszintézissel előállított $A\beta_{1-42}$ monomerek [180] a hordozóról való lehidrolizálás után azonnal aggregálódni kezdenek, az így elkészített liofilizátumok különböző, rosszul definiált aggregátsági fokú peptideket tartalmaznak. Emiatt a kísérleti felhasználást megelőzően az oldatokat elő kell készíteni.

A fent említett liofilizátumot először 100 %-os hexafluoro-izopropanolban (HFIP) feloldottuk (6 óra oldódási idő, időnként újra felszuszpendálva). A feloldás során az $A\beta$ aggregátumok disszociálnak, így monomer oldatot állítottunk elő. Ha a minta a szintézis során alkalmazott oldatokból visszamaradt sót tartalmaz, az rosszul oldódik HFIP-ben, így szűrőssel és centrifugálással eltávolítható. Ennek érdekében a mintákat asztali Eppendorf centrifugában 10000 g mellett 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszóval dolgoztunk tovább. A HFIP-ben oldott $A\beta_{1-42}$ mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd liofilizáltuk. A liofilizátumot hűtött mesterséges cerebro-spinális folyadék (ACSF, 124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.0 mM $MgSO_4$, 1.25 mM KH_2PO_4 , 26 mM $NaHCO_3$, 10 mM glucose, 4 mM sucrose, 2.5 mM $CaCl_2$)-ben 200 μ M-os koncentrációban feloldottuk, majd aliquotokra mértük szét. Az aliquotokat ismét folyékony nitrogénben fagyasztottuk le, majd a kísérleti felhasználásig $-80^\circ C$ -on tároltuk. A 0 órás $A\beta_{1-42}$ hatásának vizsgálatához közvetlenül a beadás előtt olvasztottuk fel a mintát. Oligomerek, különböző méretű aggregátumok előállításához a szobahőmérsékleten történő 24-72 órás inkubálás bizonyult megfelelőnek.

III.2. Az aggregációs fok utólagos ellenőrzése a kísérletben alkalmazott oldatokban

Az A β aggregátumok ACSF-ben felvett morfológiáját, méretét, és amyloid képző sajátságait 0, 24 illetve 72 órás inkubáció után atomi erő mikroszkópos (AFM) és elektronmikroszkópos (EM) felvételek, valamint thioflavin-T (ThT) fluoreszcencia alapján határoztuk meg.

III.2.1. Atomi erő mikroszkópos mérések

A 0 órás minták esetén az AFM méréseket beszárított mintákon végeztük. Az A β mintákat 10-szeres desztillált vizes hígításban mica felszínre vittük fel. 10 perces inkubációs idő elteltével a mica lemezt desztillált vízzel öblítettük, majd levegőn beszárítottuk. Ugyanezen protokoll a 24 és 72 órás minták esetén nem szolgált kielégítő eredményekkel, mert a nagyobb aggregátumok kötődése a mica felszínhez gyengébb. Ebben az esetben az AFM mérést ACSF oldatban végeztük. Az A β mintákat ebben az esetben ACSF-fel 500- illetve 1000-szeresre hígítottuk. 2 perc inkubációs idő elteltével az oldat zömét leittattuk, majd desztillált vízre cseréltük.

A felvételeket non-kontakt módban készítettük egy MFP-3D (Asylum Research) AFM készülékkel, szilikon-nitrid „lapka” használatával (Olympus AC160 és Olympus BioLever for wet and dried samples, értelemszerűen). A vezérlő amplitúdót és a kontakt erőt minimumon tartottuk. A mintaterületeket (1-5 μ m szélesség) 0,5-1 Hz sebességgel szkenneltük, és 512 x 512 pixel méretű képeket készítettünk. A minták kiértékeléséhez legalább 200 elkülönülő aggregátum mica felszín feletti magasságát mértük, MFP-3D szoftver (Asylum Research, Santa Barbara, CA) használatával. A nagyobb objektumokat, melyekről egyértelműen megállapítható volt, hogy több aggregátum összecsapódásából származnak (feltehetően az AFM minta előkészítésének műtermékei) kizártuk az analízisből.

III.2.2. Elektronmikroszkópos mérések

Az EM mérések elvégzéséhez a mintákat desztillált vízben 10-szeresre hígítottuk, majd 300-mesh formvar/carbon bevonatos réz rácstra vittük fel. 1 perc kötődési idő kivárása után 40 másodperces inkubációs idő mellett 1%-os uranil-acetátos kontrasztosítást végeztünk. A rácsokat JEOL 100 CX II transzmissziós elektronmikroszkóppal (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) vizsgáltuk. A felvételek elkészítésekor 60 kV-os gyorsítófeszültséget használtunk.

III.2.3. Thioflavin T mérések

A thioflavin T fluoreszcencia mérések során a mintákat 3 µl-es aliquotokra osztottuk. Az aliquotokhoz 1 ml ThT oldatot adtunk. A ThT oldat 5 µM-os volt ThT-re nézve, és tartalmazott glicint 50 mM, valamint NaCl-ot 100 mM koncentrációban. A mérőoldat pH-ját 8,5-re állítottuk be [181].

A ThT fluoreszcencia intenziását 485 nm-es hullámhosszon mértük, 445 nm-es excitáció hatására 25 °C hőmérsékleten. A méréshez Fluomax (SPEX Industries, Edison, NJ, USA) készüléket használtunk. Az excitáció sáv szélességét 5, az emisszió sáv szélességét 10 nm-re állítottuk be.

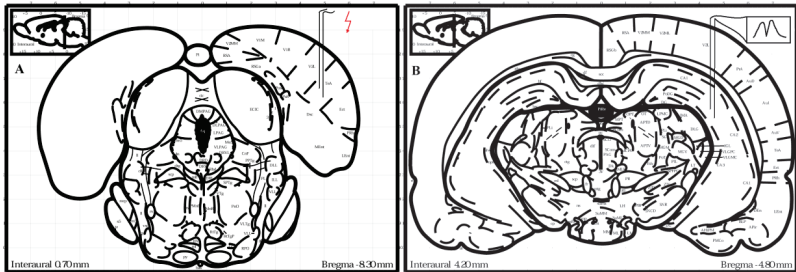
III.3. A hippokampális piramisjelek populációs tüzelésére gyakorolt hatás vizsgálata

Vizsgálataink során patkány hippokampuszban regisztrálható populációs tüzelés (pop-spike) amplitúdóváltozását vizsgáltuk kontroll, valamint különböző aggregátságú amyloid oldatok beadása után.

A kísérleteket az ELTE-TTK Biológiai Intézetének állatházában tenyésztett Sprague-Dawley (SPRD) patkánytörzsön, ~250g-os hím egyedeken végeztük. Az állatokat 12-12 órás fény-sötét ciklusban tartottuk. Ivóvíz és táp folyamatosan rendelkezésre állt az állatok számára.

III.3.1. Akut kísérletek

A kísérleti állatokat 20 v/v %-os uretánnal (Sigma-Aldrich Co., Budapest, Magyarország) altattuk. Az altatót 1 g/testsúly kg dózisban alkalmaztuk. Altatás után az állatokat sztereotaxisba helyeztük. A kísérletek alatt fűtő paddal (TMP-5b, Supertech Kft., Pécs, Magyarország) biztosítottuk az állatok állandó testhőmérsékletét. A pop-spike jelenség kiváltását a perforáns pálya (AP:-8,3 L:4,8 V:3,4) [182] bipoláris elektróddal (California Fine Wire, stainless steel 316LVM, NY Bond, bifilar) történő ingerlésével végeztük. Az ingerléssel a hippokampális neuronok szinkron kisülését válthatjuk ki (7.A ábra). Az akcióspotenciálok sorozatának eredője a regisztrátumon a populációs tüzelés [121]. Az ingerszélesség 0,1 ms-os volt, erősségét minden kísérlet során egyedileg határoztuk meg úgy, hogy a regisztrátumon a pop-spike amplitúdója a maximális amplitúdó ~1/3-a legyen. Két ingerlés között 60 másodperces időintervallumot vártunk. A regisztráláshoz szintén bipoláris elektródot használtunk. Az elektródot a *gyrus dentatus* hílusába (AP:-4,8 L:4,5 V:4,5) juttattuk be (7.B ábra). Az így mérhető gyors potenciálváltozás a két pólus közé eső sejtek tüzeléséről ad tájékoztatást. A kontroll felvétel kezdete előtt mind az ingerlő, mind a regisztráló bipoláris elektródokat a célterületüktől 1 mm távolságból lassan lefelé mozgattva



7.ábra: Az ingerlő (A) és mérő (B) elektródok pozíciói.

kerestük meg az optimális dorzo-ventrális pozíciójukat a populációs tüzelés felvételéhez. Mivel a populációs tüzelés amplitúdója nagy egyedi variációt mutat, minden kísérlet elején 60 perces kontrollt regisztráltunk. A kontroll utolsó 30 percében felvett 30 regisztrátum szolgált az adott kísérlet „alapvonalául”. Az eredményeket ennek függvényében számoltuk ki, így az amplitúdó értékek a kontroll százalékában kerülnek közlésre. Minden közölt amplitúdó érték 10 regisztrátumon mért amplitúdó átlaga. A populációs spike amplitúdóján kívül kiértékelésre került a pop-spike előtt mérhető (+) lejtőjű lassú potenciálváltozás meredeksége is, mely az fEPSP-vel arányos. Kísérleteink során páros ingerléses paradigmával facilitációt váltottunk ki. Az ingerlések között 150 msec késleltetést alkalmaztunk.

Az amyloid oldatainkat 200 μ M-os koncentrációban közvetlenül a hippocampusba adtuk be egy, a mérő elektródunkra rögzített kapilláris segítségével (Fused Silica Capillary TSP075150). A kapilláris a mérő elektród hegye fölött 0,3-0,5mm-rel végződött. A szöveti roncsolódás minimalizálása érdekében a beadást lassan, 1 μ l/10 perc sebességgel végeztük, egy KD-Scientific típusú pumpával (KD-Scientific 1001i, KD-Scientific Inc., Holliston, MA, USA). Az ingerléshez Supertech BioStim stimulátort használtunk, a regisztrációt Nihon Kohden Neurofax EEG erősítő (time constant: 5,0sec, low pass filter: 3000Hz, sensitivity: 300 μ V/mm) és CED 1401 A/D konverter segítségével, Signal 2.0 szoftverrel végeztük. A kiértékelés AxoGraph X 1.1, Origin 7.0, valamint Statistica 7.1 szoftverrel történt. A páros ingerléses facilitáció esetében a facilitációs koefficiens a második ingerre adott válasz (pSpike amplitúdó) és az első válasz arányaként határoztuk meg.

Ezekben a kísérletekben csoportonként sorrendben 5, 6, 5 állatot használtunk fel, melyeket rendre ACSF, 0, 24 és 72 órán át sötétben, szobahőn tárolt (aggregáltatott) amyloid oldattal kezeltünk.

III.3.2. Krónikus kísérletek

Irodalmi adatok tanúskodnak arról, hogy az uretán-altatás befolyásolhatja a hippocampális populációs tüzelés amplitúdóját [183]. Ennek tisztázása végett 15 állatba krónikusan beültetett elektródákat helyeztünk, az akut kísérletekkel megegyező koordináták szerint. Az elektródok optimális dorzo-ventrális pozicionálását a műtét alatt az akut kísérletek leírásában közölt módszer szerint végeztük. A beültetést Halothan altatásban végeztük (Narcotan, ~1v/v%). A hippocampusba ültetett elektródra vezető kanült rögzítettünk, melyet az elektróddal együtt építettünk be. A vezető kanül belsejébe mandrint helyeztünk, hogy elkerüljük az eltömődését. A vezető kanül 0,5mm-rel az elektródok hegye fölött végződött.

A méréseket 1 hét műtét utáni regenerációs idő elteltével végeztük. A mérések előtt a mandrint eltávolítottuk, és a kanülbe egy kapillárist vezettünk, amely 1mm-rel nyúlt túl a vezető kanül végződésén. Az oldatokat ezen a kapillárison keresztül juttattuk a szövetbe a fent leírt módszerrel megegyezően. Csoportonként 5-5 állatot rendre ACSF, 24 és 72 órán át a fentiekkel megegyező körülmények között aggregáltatott amyloid oldattal kezeltük. A méréseket, adatrögzítést és kiértékelést az akut kísérletek során használt felszereléssel végeztük.

III.4. A megnövekedett tónusos GABA_A gátlás hatásának farmakológiai vizsgálata *in vivo*

Korábbi *in vitro* eredmények tanúsága szerint az abszensz epilepszia modellállataiban a thalamusz ventro-bazális magcsoportjának (VB) thalamo-kortikális sejteinek (TC sejtek) rendellenesen megnövekedett tónusos GABA_A áram mérhető egész sejt feszültség-zár módszerrel (ld. I.4).

Kísérleteinkhez Wistar patkányokat használtunk. Izoflurán altatásban, vezető kanülöket (Carnegie Medicin, Stockholm, Svédország) ültettünk be bilaterálisan a thalamusz ventro-bazális magcsoportja (VB) fölé, valamint 6 db epidurális csavar elektródot EEG elvezetés céljából (2 frontális, 2 parietális, 2 cerebelláris, földelő elektród).

A méréseket 1 hét regenerációs idő elteltével végeztük. A kísérletek előtt a vezető kanülökbe mikrodialízis szondákat helyeztünk (CMA/12, 2 mm hosszú, 500 µm külső átmérőjű; Carnegie Medicin, Stockholm, Svédország), és ezeken keresztül, reverz-mikrodialízissel juttattuk be a hatóanyagokat. Az állatokat EEG készülékhez csatlakoztattuk (Neurolog, Digitimer Ltd, Welwyn Garden City, Egyesült Királyság), majd 1 óra folyamatos dialízis elteltével (szöveti regeneráció a szonda behelyezése után) 1 óra kontrollt regisztráltunk. A kiértékelés során a kontroll utolsó 20 percét vettük figyelembe (ld. eredmények ábrái). A kontroll (ACSF) után a dialízis pumpában oldatot cseréltünk. A bejuttatott hatóanyagok kísérletenként különböztek. A GABA_A δ alegységének szerepét egy specifikus agonista (THIP, 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-ol, 30–100 µM koncentráció tartományban) bejuttatásával, a háttér GABA szint szerepét egy, az 1-es típusú GABA transzporterre (GAT-1) specifikus antagonistával (NO-711, 1-(2-(((diphenylmethylene)amino)oxy)ethyl)-1,2,5,6-tetrahydro-3-pyridinecarboxylic acid, 200 µM) vizsgáltuk.

δ alegység tartalmú GABA_A receptorokra specifikus antagonisták jelenleg nem áll rendelkezésre, ezért ezekhez a kísérletekhez a receptor expressziójának csendesítését alkalmaztuk. A vizsgálatokhoz GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg) patkányokat használtunk. A receptor expressziójának csökkentése

érdekében az mRNS-ére specifikus antiszensz oligo-deoxi-nukleotidokat (aODN) juttattunk a VB-be a műtét során. A kísérletek kontrolljaként az azonos összetételű, de nem megfelelő nukleotid sorrendű, úgynevezett miszszensz oligo-deoxi-nukleotidokat (mODN) juttattunk be a VB-be. A kezelés előtt minden kísérleti állatról 1 órás EEG felvételt készítettünk, így minden állat rendelkezett saját kontrollal (önkontroll). Az eredményeket ezen kontroll százalékában közöltük. A patkány δ alegység specifikus aODN-t a korábban egerekben használt aODN alapján rendeltük meg [184], amely nem mutatott szignifikáns homológiát semmilyen egyéb, GenBank-ban fellelhető szekvenciával. A szekvencia a következő volt: CGT TTA TAC CTT ATG TGG TA. A kontrollként alkalmazott mODN szekvenciája ATG GTA TAT TCC ATG TTT GC volt. A beinjektált ODN-ok terjedését 3' biotinilált aODN beinjektálásával jelenítettük meg. Az ODN-okat a Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, Egyesült Királyság) cégtől rendeltük meg.

A fent leírt kísérletek során a kiváltott abszensz rohamok ellenőrzéseként megismételtük a méréseket, de az állatok a kísérlet kezdetén etho-szuximid (ETX) kezelést kaptak (anti-abszensz hatóanyag).

III.5. A perifériás lipopoliszacharid beadás kortikális és thalamikus hatásának proteomikai vizsgálata

III.5.1. A szövetminták előkészítése és a DIGE módszer

Az LPS kezelt (n=6) és a fiziológiás sóoldattal kezelt patkányokat (n=6) a kezelés után 12 órával feláldoztuk, és agyukat rövid idő alatt (<20 másodperc) kivettük a koponyából, és azonnal szárazjégen hűtöttük. A proteomikai vizsgálatokhoz egy jéghideg petricsészén izoláltuk a fronto-parietális kérget és a thalamust. Az agymintákat a későbbi felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A DIGE módszerhez a mintákat először mechanikusan homogenizáltuk proteáz és foszfatáz inhibitor tartalmú lízis pufferben (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 20 mM Tris, 5 mM magnesium-acetate, pH 8,5, Protease Inhibitor Mix, 1:1000, GE Healthcare, Little Chalfont, UK), majd szonikáltuk (10 x 10 másodperc) és centrifugáltuk (14000 g, 1 óra, 4 °C). A felülúszó pH-ját 8,5-re állítottuk, és a minták protein tartalmát 2D-Quant Kit-tel (GE Healthcare) meghatároztuk. A protein tartalom 3 és 6 µg/µl között volt. Ezután 50 µg protein tartalmú mintát megjelöltünk CyDye DIGE Fluor Minimal Labeling Kit-tel (GE Healthcare). A CyDye festék koncentrációja 400 pmol/50 µg protein volt. Az LPS-szel vagy fiziológiás sóoldattal (kontroll) kezelt patkányok agy-lizátumát Cy3-mal vagy Cy5-tel jelöltük (3-3-at mindegyik festékkel), valamint a referenciát (poolozott belső sztenderd, ami egyaránt tartalmazza az összes LPS és fiziológiás sóoldat kezelt patkány agymintáját) Cy2-vel jelöltük meg, a 30 perces reakció idő letelte után a reakciót lizin hozzáadásával állítottuk le. (A jelölés a fehérjemolekulák lizin ε-aminocsoportján történik). 6 gél-t futtattunk, minden egyes gél 3 különbözően jelölt mintát tartalmazott. A jelölt proteineket amfolit tartalmú ((0,5 v/v %), DTT (0,5 m/v %), 8 M urea, 30 % glycerine, 2 % CHAPS), izoelektromos fókuszáló (IEF) pufferbe tettük, és 24cm-es IPG csikokra passzívan rehidráltuk egy éjszakán keresztül szobahőfokon. A rehidráció után a fehérjék eltérő izoelektromos pontja szerinti első dimenziós elválasztást végeztük el, 24 órán keresztül, 30 V 3,5 óra step, 500 V 5 óra gradiens, 1000 V 6 óra gradiens, 8000 V 3 óra gradiens, végül 8000 V 6,5 óra step mód lépésekben (Ettan IPGphor 3, GE

Healthcare). A fókuszált proteineket először 20 percig redukáltuk 1% (tömeg/térfogat) merkaptó-etanol (Sigma) tartalmú equilibráló pufferben, majd alkiláltuk 2,5% (tömeg/térfogat) jód-acetamid (Sigma) tartalmú pufferben, szintén 20 percig. Ezután az IPG csíkokat 10%-os poli-akrilamid gélre helyeztük (24 x 20 cm), és SDS-PAGE-t végeztünk 10 W/gél teljesítménnyel (Ettan DALTSix System, GE Healthcare). Az elektroforézis után a géleket TyphoonTRIO+ szkennelvel beolvastuk a megfelelő lézerek és szűrők használatával, 610V fotomultiplier (PMT) beállítás mellett.

III.5.2. Adataelemzés, statisztika, preparatív 2D gél elektroforézis

A kvantitatív differenciál protein analízist a DeCyder szoftvercsomag Differential In-gel Analysis (DIA) és Biological Variance Analysis (BVA) moduljainak (GE Healthcare) segítségével végeztük. A p értékeket (Student t -teszt) minden egyes protein foltra meghatároztuk ($p < 0.05$). A belső sztenderd egyenlő mennyiségű fehérjét tartalmazott (az összes minta azonos koncentrációjú hánnyadát), így minden jelenlévő proteint reprezentált. A sztenderd gélképek segítségével minden más gélképet normalizálhattunk, ezáltal elimináltuk a futtatás során esetlegesen fellépő technikai különbségeket. A sztenderd proteomikai protokoll alapján [185, 186] a technika már 5% változást képes kimutatni.

A statisztikailag szignifikáns változást mutató foltokban található proteinek azonosításához külön preparatív 2D gél elektroforézist végeztünk, 800 μ g fehérjével gélenként. A protein foltokat Colloidal Coomassie Blue (G-250) festési protokoll-lal jelenítettük meg. Két preparatív gél futtattunk.

A foltokat külön-külön kivágtuk a preparatív gélből, kivontuk a festéket, majd tripsinnel (Trypsin Gold, Promega) 24 órán át 37 °C-on a gélben emésztettük Shevchenko és mtsai. nyomán [187]. A triptikus emésztésen átesett peptideket 5%-os hangyasavval vontuk ki a gél darabokból, majd vákuummal beszárítottuk.

III.5.3. LC/MS analízis és fehérje azonosítás

Az LC/MS analízist a Szegedi Orvostudományi Egyetem Orvosvegytani Intézetének munkatársai végezték el Agilent 1100 Series nano-LC kapcsolt ortogonális nanospré ionforrású, Agilent LC-MSD XCT Plus ioncsapda detektorú tömegspektrométerrel (Agilent Co., USA). A nano-LC rendszert mintadúsítás/sótalanítás üzemmódban működtették ZORBAX 300SB-C18 dúsító oszloppal (0,3 x 50 mm, 5 μ m), valamint az elválasztáshoz ZORBAX 300SB-C18 (75 μ m x 150mm) nano-oszlopot használtak. A peptidek eluálását grádiens elúcióval végezték, 300 nl/perc átfolyással, 100% A-oldattól (0,1% hangyasav vizes oldata) 40% B-oldatig (0,1% hangyasav aceto-nitriles oldata), 25 perc alatt. A tömegspektrométert „peptide scan auto-MS-MS” módban üzemeltették, felvéve a teljes MS spektrumot (300-1600 m/z), 8100 u/s sebességgel és kisebb, mint 0,35 u (FWHM) felbontással. A négy legnagyobb abundanciát mutató csúcsból automatikus adatfüggő MS/MS segítségével MS/MS spektrumot vettek fel (100-1800 m/z, 26000 u/s, 0,6 u-nál kisebb felbontás, FWHM).

A felvett adatok kiértékelését és a csúcsok listájának elkészítését Agilent DataAnalysis 3.2 szoftverrel, alapbeállítások mellett végezték. Minden MS/MS mintát Mascot 2.2.04 (Matrix Science, London, UK) és X! Tandem (www.thegmp.org; 2007.01.01.0) segítségével analizáltak. A Mascot-ot és az X! Tandem-et a Swissprot 56.8 adatbázis (2009.02.10 kiadás, 410.518 bejegyzés) keresésére állították be, tripszin emésztés feltétellel. Mindkét keresőprogram 0,80 Da fragmens ion toleranciával és 1,5 Da szülőion toleranciával keresett. A cisztein jodo-acetamid származékát, mint fix modifikációt, valamint a metionin oxidációját, mint változó modifikációt határozták meg a Mascot-ban, és az X! Tandem-ben.

Az MS/MS alapú fehérje azonosítás ellenőrzését Scaffold (Scaffold_2_02_03, Proteom Software Inc., Portland, OR) segítségével végezték. A peptid azonosítást 95,0% valószínűség fölött fogadták el, a fehérje azonosítást 95,0% valószínűség, és legalább 2 azonosított peptid esetén fogadták el.

III.5.4. A proteomikai adatok interpretációs modellezése

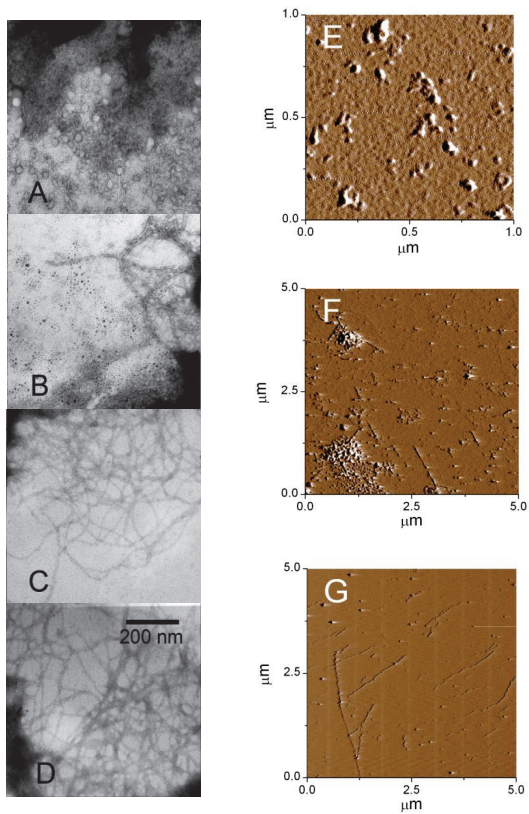
A proteomikai adatok interpretációjának érdekében először az adatokat táblázatokba rendeztük, melyek a fehérje nevét, és fő azonosítási adatait tartalmazták. Ebben a fázisban manuális ellenőrzést és kezdeti funkcionális besorolást használtunk. A megváltozott proteinek listáját Ariadne Genomics Pathway Studio[®] 7.1 (Ariadne Genomics, Inc, Rockville, MD, USA) szoftverkörnyezetbe helyeztük, amely egy gyakran frissített fehérje interakció adatbázis, és fehérje hálózat modellező program egyben. A fehérje hálózat modelleket megalkottuk a megváltozott proteinek alapján, és a hálózatokat beépített funkciók segítségével vizsgáltuk.

Mivel az LPS az NFκB transzkripció faktoron keresztül gyorsan növeli a gyulladást serkentő fehérjék (kemokinek, citokinek, enzimek és sejtadhéziós molekulák) szintézisét, megvizsgáltuk, hogy vajon ezek a fehérjék köthetők-e az általunk megváltozott expressziójának talált fehérjékhez a protein interakció adatbázisban.

IV. Eredmények

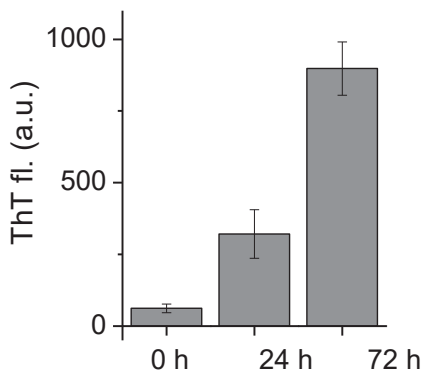
IV.1. Az A β oldatok *in vitro* karakterizálása és reprodukálhatósága

A 0 órás mintákban fibrilláris aggregátumok sem az EM, sem az AFM képeken nem voltak felfedezhetőek (8.A és E ábra). Az AFM kép tanúsága szerint az oldat feltehetően monomerek és kisméretű oligomerek keverékét tartalmazta, melyek magassága a monomerek esetében 0,5nm, a kis oligomerek esetén 1-2nm körülire tehető. Ezek az A β ₁₋₄₂ formák nagy affinitással kötődnek a mica felszínéhez, teljesen beborítva azt. A 24 órás mintákban már megjelennek a nagyméretű oligomerek és nem-specifikus aggregátum formák, valamint néhány fibrilláris szerkezet is fellelhető (8.B és F ábra). A háttér (mica felszíne) tisztább, ami a monomerek és a kis oligomerek mennyiségének csökkenését jelzi. A felszínhez való csökkent kötődés okán a 72 órás minták AFM-es vizsgálata beszárított mica-án nem volt kivitelezhető, ezért ezeket a mintákat oldatban végzett AFM mérésekkel analizáltuk. A felvételeken jól látható volt a kiterjedt fibrillum képződés, míg a nagy oligomerek és egyéb aggregátumok mennyisége jelentősen csökkent (8.C és G ábra). A 8.D ábra 1 héten át aggregáltatott amyloid oldat EM képe. Jól látható, hogy a 72 órás oldatról készült képpel összehasonlítva nem történt jelentős változás az aggregáltsági fokban illetve valamivel több fibrilláris, és kevesebb oligomerizált formát tartalmazott.



8. ábra: Különböző aggregáltsági fokú β -amyloid oldatok EM (A-D) és AFM (E-G) képe. A-D: Sorrendben 0, 24, 72, 168 órás oldatok EM képe. E-G: Sorrendben 0, 24, 72 órás oldatok AFM képe (Orbán et al., *Brain Res.*, 2010).

A fibrilláris struktúrák előfordulását a mintákban ThT fluoreszcencia mérésekkel is vizsgáltuk. A ThT megnövekedett fluoreszcencia intenzitást mutat az amyloid fibrillumokhoz való kötődésekor, míg monomerek, vagy egyéb aggregátumok jelenlétében fluoreszcencia intenzitása alacsony [188, 189]. Mint azt a 9. ábrán bemutatjuk, a ThT fluoreszcencia intenzitása az oldatok inkubációs idejével szignifikánsan növekszik, ami az EM és AFM mérésekkel egybehangzóan a fibrillumok mennyiségének növekedését jelzi.



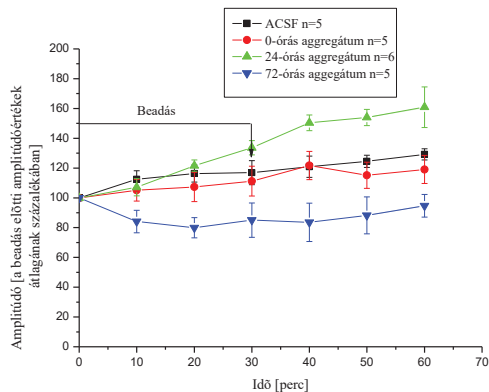
9. ábra: Különböző aggregátsági fokú β -amyloid oldatok ThT fluoreszcencia-intenzitása. A ThT fluoreszcencia intenzitás az aggregációs idő előrehaladtával szignifikánsan növekedett a 0 órás mintához képest ($p=0,005$) (Orbán et al., *Brain Res.*, 2010).

Az eredmények értelmezése: Összességében elmondhatjuk, hogy az inkubáció idejével megváltozik az aggregációs összetétel mind az aggregátumok morfológiája, mind pedig mérete tekintetében. Közvetlenül az oldás után monomerek és kis oligomerek találhatók az oldatban. Ezek mennyisége az idő előrehaladtával csökken, míg a nagyobb méretű aggregátumok mennyisége folyamatosan növekszik. A nagy oligomerek és nem-specifikus aggregátumok mennyisége a 24 órás mintákban éri el maximumát. A későbbiekben ezek mennyisége is csökkenni kezd. A 72 órás mintákban ezek már csak kis mennyiségben vannak jelen, és a domináns aggregátum formává a fibrilláris β -amyloid válik.

IV.2. Ellenőrzött méretösszetételű amyloid aggregátum oldatok hatása a patkány hippocampális populációs tüzelésére

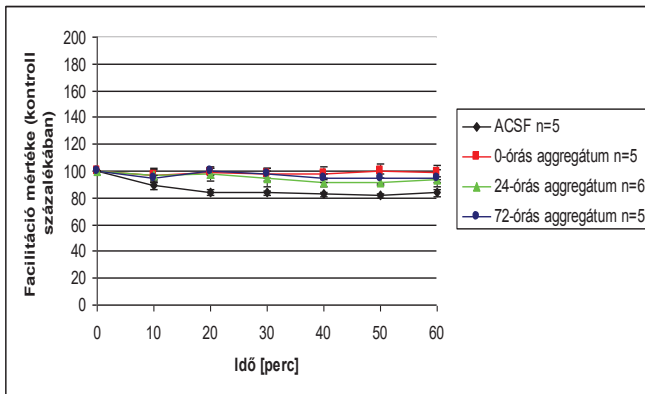
IV.2.1. Altatott állatokon végzett kísérletek

A 0 órás oldattal kezelt állatok esetében a pSpike amplitúdója nem változott. A 24 órás oldat növelte, míg a 72 órás oldat csökkentette az amplitúdót az ugyanazon időpontban mért kontroll (ACSFF kezelt) állatokéhoz képest. A mért amplitúdók a 24 órás aggregáltatás esetén a kontroll $130 \pm 14\%$ -ára, a 72 órás esetében $65 \pm 8\%$ -ára változtak 40 perccel az infúzió vége után (10. ábra).



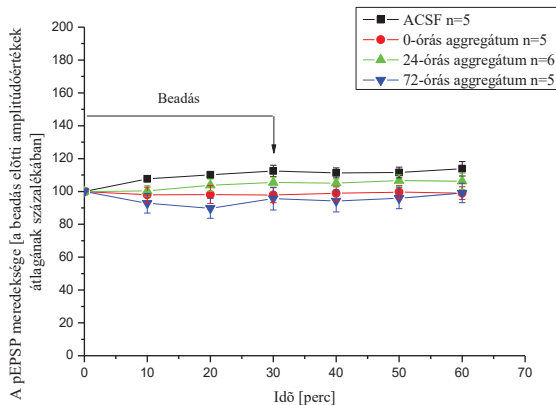
10. ábra: A pSpike amplitúdójának változásai különböző aggregáltsági fokú β -amyloid oldatok beadása után. Mind a 24, mind pedig a 72 órás amyloid oldat szignifikánsan növelte illetve csökkentette a pSpike amplitúdóját. A 0 órás oldat hatástalannak bizonyult ($p=0,05$) (Orbán et al., *Brain Res.*, 2010)..

A páros inger paradigmával mért facilitáció mértéke egyik kezelés esetén se változott (11. ábra).



11. ábra: A **páros ingerléses facilitáció mértéke**. A facilitációs koefficiens a kontrollban számolthoz képest nem változott szignifikánsan egyik oldat hatására sem.

A pEPSP meredeksége egyik kezelés esetében sem tért el szignifikánsan a kontroll kísérletektől (12. ábra).



12. ábra: A **pEPSP meredekségének változásai különböző aggregáltsági fokú β -amyloid oldatok beadása után**. A pEPSP meredeksége egyik oldat hatására sem változott szignifikánsan a kontrollhoz (ACSF) képest (Orbán et al., *Brain Res.*, 2010)..

Az eredmények értelmezése: Az altatott állatokon végzett kísérletek eredményeiből világosan látszik, hogy a kisméretű aggregátumok hatására a sejtek tüzelékenysége növekszik, nagy oligomereket és részben szálak struktúrákat tartalmazó oldat hatására viszont csökken. A párosinger paradigmával, a facilitatív interneuronok és szinapszisaik szerepéről kapott információ tanúsága szerint a populációs tüzelés amplitúdójának változása nem köthető a facilitatív bemenetek befolyásoltságához. A tapasztalt jelenséget nem kíséri a populációs tüzelés előtt mérhető pEPSP görbe meredekségének változása, tehát a szóbanforgó sejtek bemenetei, a szinapszisok EPSP genezis képessége változatlan. Összességében ugyanakkora EPSP hatására a sejtek többet tüzelnek.

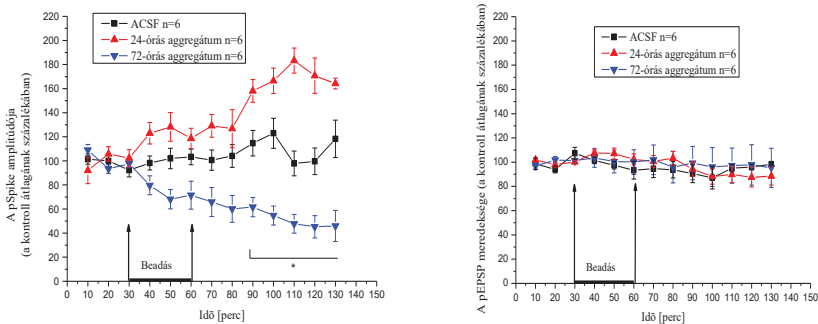
A kontroll kísérletek eredményének értelmezése alapján elmondható, hogy maga az uretán altatás is befolyásolja a populációs tüzelést. A mérés során az idő elteltével fokozatosan növekedtek a válaszok. Ez csökkentheti, elfedheti az excitabilitás változásait, ezért indokolt a fenti mérés megismétlése éber, viselkedő állaton.

IV.2.2. Éber állatokon végzett kísérletek

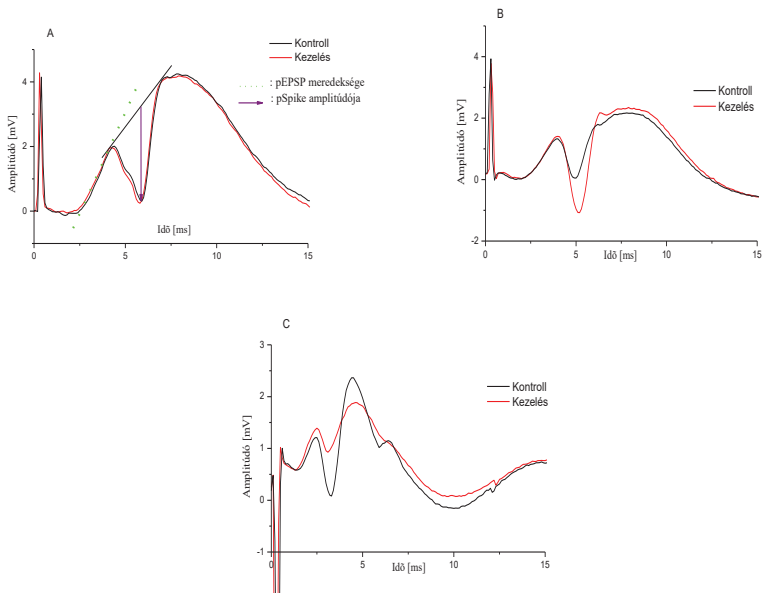
Az altatott állatokon hatásosnak bizonyult oldatok vizsgálatát a fent említett okból megismételtük éber állatokon is. Hasonló, de sokkal nagyobb mértékű változásokat tapasztaltunk.

A 24 órás amyloiddal kezelt állatok esetén a pSpike amplitúdó a kontroll $170 \pm 14\%$ -ára nőtt, míg a 72 órás amyloid hatására a kontroll $45 \pm 10\%$ -ára csökkent (13. ábra bal). A hatás a maximumát a beadás után 50 perccel érte el. Az altatott állatokon tapasztaltnál hasonlóan a pEPSP mereksége most is változatlan maradt (13. ábra jobb).

A jelenséget példa felvételeken bemutatva a 14.A-C ábrán mutatjuk be. A 14.A ábrán a könnyebb értelmezhetőség érdekében a mért paramétereket is bejelölttem.



13. ábra: Éber állatokban mérhető pSpike amplitúdója, és a pEPSP mereksége (Orbán et al., *Brain Res.*, 2010).



14. ábra: A pSpike és pEPSP változásai 0 (A), 24 (B) és 72 (C) órás aggregátumok hatására éber állatokban (Orbán et al., *Brain Res.*, 2010 nyomán).

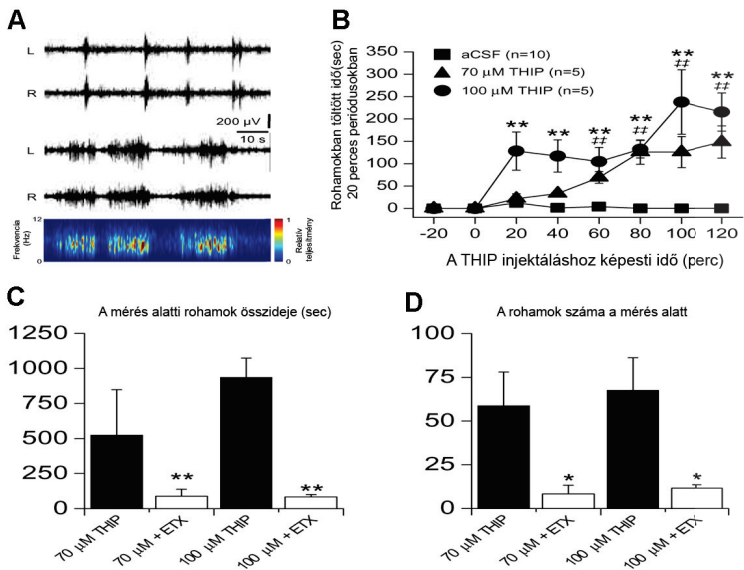
A kapott eredmények értelmezése: Az éber állatokon végzett kísérletek bebizonyították, hogy a tapasztalt jelenségek valóban a különböző aggregáltságú amyloid oldatok hatásának köszönhetőek. Ebben az esetben a kontroll (ACSF) mérés sokkal stabilabb volt, nem változott jelentősen az amplitúdó az idő elteltével. Mindemellett az aggregátumok hatása drasztikusabb volt, mint az uretán altatás mellett. Ez feltehetően az altatószer és a vizsgált anyag hatásának interakciójával illetve annak hiányával magyarázható.

A pEPSP meredeksége az altatott állatokon tapasztaltnál hasonlóan itt is változatlan maradt.

IV.3. A tónusos GABA_A gátlás szerepe az abszensz epilepsziában *in vivo*

IV.3.1. A GABA_AR α 0 specifikus agonistájának (THIP) hatása naív (Wistar) patkányban

Kísérleti eredményeink tanúsága szerint nem-abszensz epilepsziás (naív) Wistar patkányokban a VB-be juttatott specifikus agonista hatására dóziszfüggő módon SWD-k jelennek meg az EEG regisztrátumon, míg a vivőanyag (ACSF) hatástalannak bizonyult (15.A ábra). A rohamok spektrál analízise alapján elmondható, hogy a legnagyobb teljesítményű komponens 6-8 Hz közé esik, amely szintén jellemző az abszensz epilepsziára (15.A ábra). Az EEG rendellenességekhez társultan viselkedészavarokat tapasztaltunk. Kísérleti állataink a rohamok alatt nem mozogtak (behavioural arrest) illetve az abszensz modellállatokra jellemző apró fejbiccentéseket (head nodding) mutattak. A roham elmúltával a félbeszakadt viselkedés folytatódott. A 15.B ábrán a kezelés hatásának időbeli lefutását, a 15.C és D ábrán az abszensz epilepsziás állapot kvantifikálására használt paraméterek egész kísérlet alatti kumulatív értékeinek alakulását láthatjuk. Az ETX előkezeléssel sikeresen gátolni tudtuk a rohamok, és a rendellenes viselkedés megjelenését (15. C és D ábra).



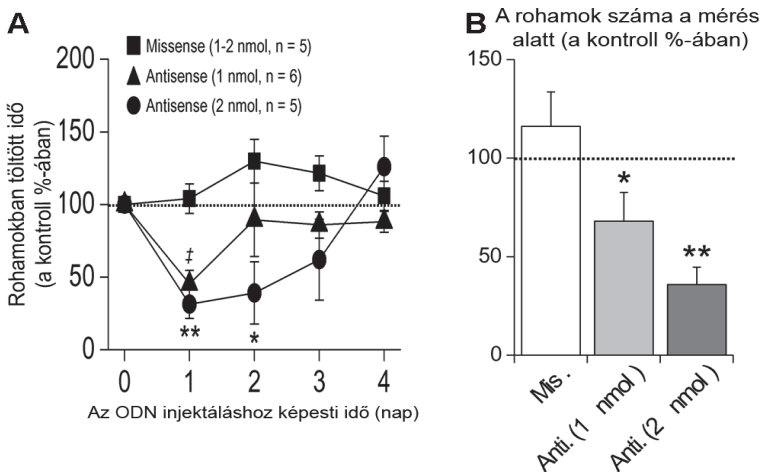
15. ábra: **A THIP kezelés hatására kialakuló abszensz epilepsziás rohamok.** A: Példaregisztrátumok a 70 illetve 100 μM -os THIP kezelés során. A panel alsó részén látható a 100 μM -os példaregisztrátum spektrál analízise. B: A THIP kezelés hatásának időbeli lefutása. A 70 μM -os oldat az oldatcserétől számított 60. perctől, míg a 100 μM -os oldat a 20. perctől szignifikánsan növelte az abszensz rohamok számát (ANOVA, **: $p \leq 0,01$, #: $p \leq 0,05$). C és D: ETX i.p. előkezeléssel gátolható volt a THIP hatása (Student *t*-teszt, **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$) (Cope et al., *Nat. Med.*, 2009).

A kapott eredmények értelmezése: A „tónusos” GABA_A gátlás farmakológiai növelése a VB-ben elegendő feltétele az abszensz epilepszia kialakulásának Wistar állatokban. A hatás kivédhető ETX előkezeléssel.

IV.3.2. A GABA_AR δ expresszió csökkentésének hatása az abszensz epilepsziára GAERS patkányokban

A receptor mRNS-ére specifikus aODN hatására szignifikánsan csökkent az abszensz rohamok száma és a rohamokban töltött teljes idő, míg a kontroll kísérletek

során alkalmazott mODN oldat hatástalannak bizonyult (16. ábra). A kísérletek során 24 órával a beadás után tapasztaltuk a hatás maximumát, majd az 1 nmol-os és 2 nmol-os kezelés hatása rendre a 2. és 3. napon megszűnt, feltehetően a beinjektált ODN-ek lebomlása, és az expresszió újraindulása miatt.

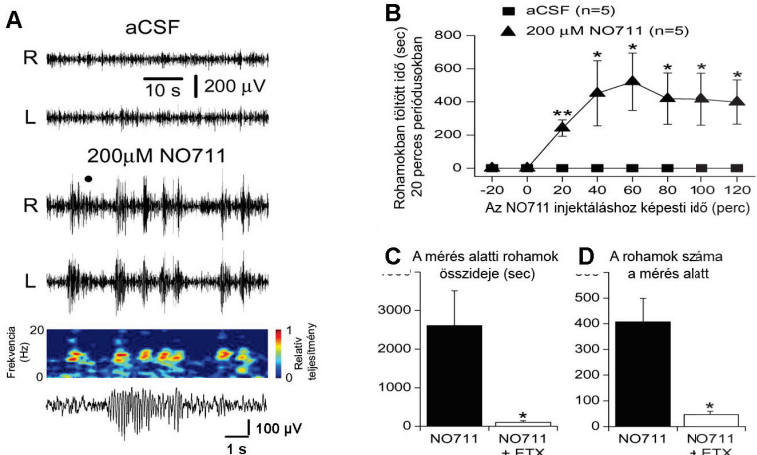


16. ábra: A $GABA_A$ R α expresszió csökkentése szignifikánsan csökkentette az abszensz rohamokban töltött időt és a rohamok számát. A: Az aODN kezelés hatásának időbeli lefutása. 24 óra elteltével mind az 1 nM, mind pedig a 2 nM aODN kezelés megszüntette az abszensz rohamokat GAERS patkányokban (ANOVA, **:= $p \leq 0,01$, *:= $p \leq 0,05$). Az mODN beadás hatástalannak bizonyult. B: Kumulatív ábra, az összes kísérleti állatban tapasztalható hatásról. Az ábra a kezelés utáni első napon fennálló állapotot mutatja, azaz a hatás maximumát (Student t-teszt, **:= $p \leq 0,01$, *:= $p \leq 0,05$) (Cope et al., *Nat. Med.*, 2009).

A kapott eredmények értelmezése: A „tónusos” $GABA_A$ gátlás patológias megnövekedése szükséges feltétele az abszensz epilepszia kialakulásának. A hatás maximuma 24 óra elteltével jelentkezett, feltehetően ennyi idő kellett ahhoz, hogy a receptor mennyisége elegendő mértékben lecsökkenjen a membránban.

IV.3.3. A háttér GABA szint növelésének hatása az abszensz epilepsziában Wistar patkányokban

A VB-ben a GABA eltávolításának jelentős hányadát a GAT-1 GABA szállító molekula végzi. Ez a szállító molekula a VB-ben kizárólag asztrocitákban expresszálódik. Specifikus gátlásának hatására megnő a háttér GABA szint az extracelluláris térben, ami a peri- és extracelluláris GABA_AR-ok, így a GABA_AR α fokozott aktivációjához vezet. A GAT-1 specifikus antagonistájának (NO-711) hatására abszensz rohamok jelentek meg a naív patkányok EEG-jén (17.A ábra). A rohamok spektrál analízise szerint a fő frekvencia komponens 8-12 Hz közé esett, amely kicsit magasabb, de jól közelít az abszensz epilepsziára jellemző fő frekvencia komponenshez (17. A ábra). A beadás kezdetétől számított 20. perctől szignifikánsan nőtt a rohamokban töltött idő, majd a 40. perctől elérte maximumát (17. B ábra). A rohamokhoz az előző kísérlet leírása során tárgyalt viselkedési zavarok társultak. Mind a tapasztalt SWD-k, mind pedig a viselkedészavarok gátlhatóak voltak ETX előkezeléssel (17. C és D ábra).



17. ábra: A GAT-1 GABA transzporter specifikus gátlásának hatására abszensz rohamok jelennek meg. A: EEG példaregisztrátumok, és a példában szereplő abszensz rohamok spektrál analízise. A panel

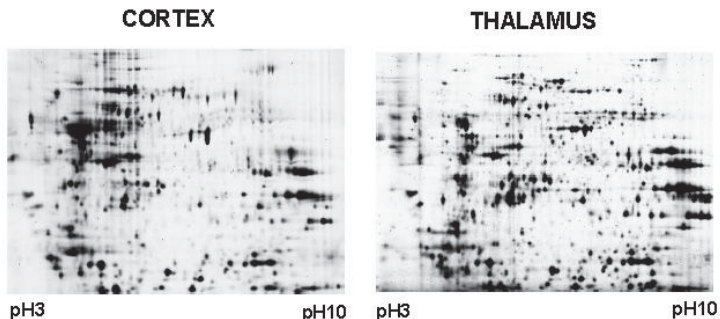
alján a „●”-tal jelölt roham nagytított képe látható. B: Az NO-711 kezelés hatásának időbeli lefutása (ANOVA, **: $p \leq 0,01$, *: $p \leq 0,05$). C és D: Kumulatív ábra. Az ETX előkezelés sikeresen meggátolta az abszensz rohamok megjelenését (Student *t*-teszt, *: $p \leq 0,01$) (Cope et al., *Nat. Med.*, 2009).

A kapott eredmények értelmezése: A GAT-1 szállító molekula specifikus gátlása elegendő feltétele az abszensz rohamok megjelenésének. A GAT-1 gátlásának hatására megnövekszik a háttér GABA szint, ami a tónusos gátlás növekedéséhez, és végül abszensz rohamok megjelenéséhez vezet.

IV.4. Az LPS megváltoztatta a cortex és a thalamusz proteomját

IV.4.1. A proteomikai mérések eredményei

A fronto-parietális kéreg és a thalamusz proteomja eltérően változott. A proteomikai mérések fényt derítettek rá, hogy a fronto-parietális kéregben 15, míg a thalamuszban 28 protein-folt változott meg szignifikánsan Student-*t* teszt alapján ($p < 0,05$). A protein-foltok változásai a -1,106 - -1.378 (csökkent koncentráció), illetve +1,062 - +2,044 (emelkedett koncentráció) tartományokba estek az LPS kezelt, és a nem-kezelt csoportok között (a belső sztenderdre normalizálva). A thalamuszban 19 protein-folt koncentrációja növekedett, míg 9 csökkent az LPS kezelés hatására (1. táblázat), míg a kéregben 8 koncentráció növekedést és, 7 csökkenést találtunk. A 18. ábrán reprezentatív gélképet mutatunk be.



18. ábra: **Reprezentatív 2 dimenziós gélképek.** Vízszintes irányban a pH gradiens mentén (3-10 nem lineáris), míg függőleges irányban a méret szerinti elválasztás látható.

A fehérje-foltokból MS-MS segítségével a kéreg esetében 16 megváltozott expressziójú fehérjét azonosítottunk, a thalamusz esetében 35-öt (1. találat). A legszignifikánsabban növekedett, s egyben legnagyobb változást mutató (+2,044) fehérje-foltból a feszültségfüggő anionszelektív csatorna fehérje 1-et sikerült

azonosítani (VDAC1) a kéregben. A legszigifikánsabban csökkent fehérje-folt az adaptin fül-kötő köpeny-asszociált fehérje 1 (NECAP1) (-1,378) volt a thalamuszban (mindkettőt egyetlen proteinként azonosítottuk az adott foltban). A két agyi struktúrában négy átfedő proteint találtunk, ezek: az ATP szintáz d alegység (ATP5H) nevű mitochondriális fehérje, a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH), a gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP), valamint a könnyű neurofilament polipeptid (NEFL). Mindemellett a foltok és megtalált fehérjék száma közvetlenül nem összehasonlítható, mivel sok esetben egy adott folt több fehérjét is tartalmazott, és ugyanazon fehérje különböző fragmentumai több foltban is előfordultak, pl mind az NEFL, mind pedig a GFAP fellelhető volt az 542TH jelű foltban, míg az NEFL ezen kívül 2 és a GFAP 3 másik foltban is jelen volt (1. táblázat). Ez bizonyos fehérje fragmentumok nagyon kis eltéréseivel, vagy egyes fehérjék fizikai interakciójával illetve a poszt-transzlációs módosításokkal (pl foszforiláció) magyarázható. Néhány kivételes esetben ugyanazon fehérje két, különböző irányba megváltozó foltban is fellelhető (1. táblázat). Így a NEFL és a 70 kDa hő sokk protein 8 (HSPA8) fehérjéket kétszer, míg az ATP szintáz béta alegység (ATP5B), GFAP, Peroxiredoxin-6 (PRDX6) fehérjéket háromszor találtuk meg a kérgi mintában, a thalamikus mintában az Apolipoprotein E (APOE), V-típusú proton ATPáz E alegység 1 (ATP6V1E1), Alfa-enoláz (ENO1), GAPDH, guanin nukleotid kötő protein G(I)/G(S)/G(T) béta-2 alegység (GNB2), maleát dehidrogenáz (MDH1), NADH dehidrogenáz [ubiquinon] flavoprotein 2 (NDUFV2), Pur-alfa transzkripció aktivátor protein (PURA), neuron specifikus szeptin-3 (SEPT3), béta tubulin 2A lánc (TUBB2A), béta tubulin 2C lánc (TUBB2C) és ubiquitin karboxil-terminális észteráz L1 (ubiquitin tiolészteráz) (UCHL1) fehérjéket kétszer találtuk meg.

Kéreg				
Folt száma	Protein neve	Gén neve	p-érték	Megváltozás mértéke (szeresére)
291CTX	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8	0.04983	1.1639
322CTX	Lamin-B1	Lmnb1	0.01688	-1.1222
383CTX	Neurofilament light polypeptide	Nefl	0.02731	-1.1064
426CTX	Neurofilament light polypeptide	Nefl	0.04963	-1.1909
476CTX	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8	0.00685	-1.1677
677CTX	Glial fibrillary acidic protein	Gfap	0.02254	1.2255
854CTX	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	Sucla2	0.03696	-1.1250
1013CTX	Endophilin-A1	Sh3gl2	0.03649	1.2627
1050CTX	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Uqcrc1	0.01333	1.1726
1071CTX	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	0.01661	1.2231
1221CTX	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	Hnrnpa2b1	0.0432	1.0620
1353CTX	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Vdac1	0.000695	2.0441
1389CTX	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	Pafah1b2	0.01417	1.1729
	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	Iah1		
	Proteasome activator complex subunit 1	Psme1		
1493CTX	Triosephosphate isomerase	Tpi1	0.03387	-1.3051
1555CTX	ATP synthase subunit d, mitochondrial	Atp5h	0.03322	-1.1371
1555CTX	Guanylate kinase	Guk1		
Thalamus				
276TH	Stress-induced-phosphoprotein 1	Stip1	0.0434	-1.2350
	Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	Myl1		
	Lamin-A	Lmna		
	Actin, aortic smooth muscle	Acta2		
	Myosin-1	Myh1		
382TH	Alpha-internexin	Ina	0.0154	1.6900

	Dihydropyrimidinase-related protein 2	Dpysl2		
445TH	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Atp5b	0.0234	1.2340
490TH	Glial fibrillary acidic protein	Gfap	0.04931	1.1200
	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Atp5b		
506TH	Glial fibrillary acidic protein	Gfap	0.047	-1.1200
	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Atp5b		
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	Hnrnp2		
542TH	Neurofilament light polypeptide	Nefl	0.0364	-1.1350
	Glial fibrillary acidic protein	Gfap		
562TH	Alpha-enolase	Eno1	0.0341	1.2680
638TH	Tubulin beta-2A chain	Tubb2a	0.0095	1.3840
	Tubulin beta-2C chain	Tubb2c		
740TH	Protein disulfide-isomerase A6	Pdia6	0.028	1.1470
751TH	Transcriptional activator protein Pur-alpha	Pura	0.0237	1.3800
	Neuronal-specific septin-3	Sept3		
	Alpha-enolase	Eno1		
	Septin-5	Sept5		
771TH	Adaptin ear-binding coat-associated protein 1	Necap1	0.0487	-1.3780
870TH	Tropomyosin beta chain	Tpm2	0.02935	1.1450
890TH	Tubulin beta-2C chain	Tubb2c	0.015	1.1930
	Tubulin beta-2A chain	Tubb2a		
	Tubulin beta-3 chain	Tubb3		
	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Atp5b		
922TH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	0.03479	-1.2000
923TH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	0.0345	-1.2200
957TH	Transcriptional activator protein Pur-alpha	Pura	0.042	1.2200
	Septin-5	Sept5		
	DnaJ homolog subfamily B member 11	Dnajb11		
	Macrophage-capping protein	Capg		
	Neuronal-specific septin-3	Sept3		
1036TH	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	Mdh1	0.043	-1.1350
1057TH	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	Mdh1	0.037	1.3170
1078TH	V-type proton ATPase subunit E 1	Atp6v1e1	0.05	-1.3100
1105TH	V-type proton ATPase	Atp6v1e1	0.0403	1.5700

	subunit E 1			
1168TH	Peroxiredoxin-6	Prdx6	0.0352	1.4580
1199TH	Apolipoprotein E	ApoE	0.0096	1.1300
	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	Gnb2		
1204TH	Peroxiredoxin-6	Prdx6	0.0042	1.3240
1221TH	Inorganic pyrophosphatase	Ppa1	0.0082	1.4560
	Apolipoprotein E	ApoE		
	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	Gnb2		
	Tubulin beta-2C chain	Tubb2c		
1228TH	Peroxiredoxin-6	Prdx6	0.0073	1.5320
	Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7	Park7		
1247TH	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Uchl1	0.0423	1.1860
	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	Ndufv2		
1273TH	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	Ndufv2	0.0037	1.1060
	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Uchl1		
1331TH	Transgelin-2	Tagln2	0.05	-1.1700
	ATP synthase subunit d, mitochondrial	Atp5h		

1. táblázat: A megváltozott protein-foltok, és azokban azonosításra került proteinek jegyzéke.

IV.4.2. A proteomikai adatok interpretációs modellezése

Proteomikai adataink interpretációs modellezéséhez a PathwayStudio® 7.1 szoftvert használtuk (Ariadne Genomics, Inc, Rockville, MD, USA) ResNet 7.0, 2010Q4 (emlős) adatbázissal. Először a csoport dúsítási analízis eszközt használtuk, hogy mért fehérjéinket sejtbeni lokalizációjukhoz kössük (2. táblázat). A program az Ariadne Ontology és a Gene Ontology adatbázisok alapján 26 citoplazmatikus, 12 nukleáris, 10 membrán és 9 mitokondriális fehérjét, 7 fehérjét mint a citoskeleto-

alkotórészét, 4 axonális fehérjét, 2 fehérjét mint dendritikus struktúrfehérjét sorolt be (2. táblázat). Ezután ugyanezen eszköz segítségével sejtteni funkciók alapján is csoportosítottuk a fehérjéket (3. táblázat). A legkiterjedtebb csoportok a fehérje kötők (29 protein) és a nukleotid kötők (12 protein), melyek funkcionálisan aspecifikusak voltak. A funkcionálisan specifikus csoportok a következők: transzport (9 protein), szénhidrát metabolizmus (5 protein), motor fehérje (4 protein), glikolízis (4 protein), transzkripció/transzláció/nukleotid metabolizmus (6 protein), idegrendszeri fejlődés (4 protein), szignál transzdukció (4 protein), fehérje hajtogatás (3 protein), oxidatív stressz válasz (3 protein), mRNS feldolgozás (2 protein), trikarboxisav ciklus (2 protein), neuron differenciáció (2 protein), axonnövekedés szabályozása (2 protein), transzkripciós faktor kötés (2 protein), szeptin komplex képzés (2 protein) (3. táblázat).

Lokalizáció szerinti csoportosítás	
Citoplazma	Sejtmag
ACTA2	CAPG
APOE	DNAJB11
ATP6V1E1	ENO1
CAPG	GAPDH
DNAJB11	HNRNPA2B1
DPYSL2	HNRNPH2
ENO1	HSPA8
GAPDH	LMNA
GFAP	LMNB1
GUK1	PARK7
HSPA8	PURA
MDH1	STIP1
MYH1	
PAFAH1B2	
PARK7	
PRDX6	
PSME1	
PURA	
SEPT3	
SH3GL2	
STIP1	
TPM2	
TUBB2A	
TUBB2C	
TUBB3	
UCHL1	

Membrán ATP5B ATP5H GAPDH LMNB1 NDUFV2 NECAP1 SEPT3 SH3GL2 UQCRC1 VDAC1	Mitokondrium ATP5B ATP5H ATP6V1E1 DPYSL2 NDUFV2 PARK7 SUCLA2 UQCRC1 VDAC1
Sejtváz struktúrális elemei ACTA2 GFAP INA NEFL TPM2 TUBB2A TUBB3	Axonális proteinek DPYSL2 NEFL PARK7 UCHL1
Dendritikus struktúr proteinek APOE DPYSL2	

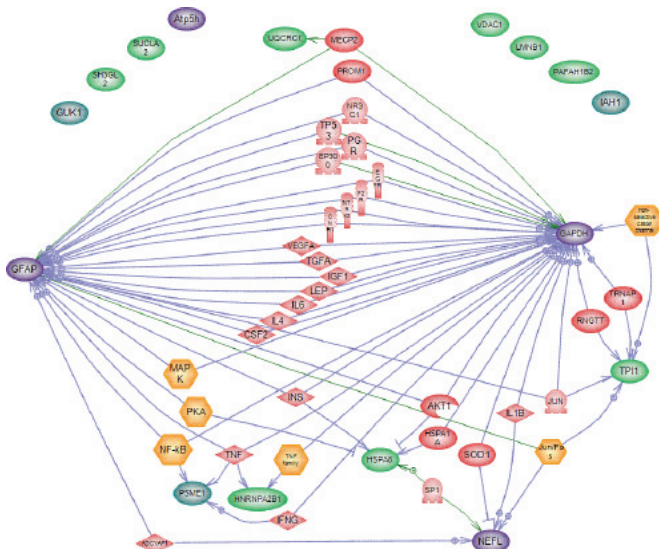
2. táblázat: A megtalált fehérjék csoportosítása sejten belüli lokalizációjuk szerint.

Csoportosítás funkciók szerint	
Protein kötés ACTA2 ATP5B ATP6V1E1 DNAJB11 DPYSL2 ENO1 GAPDH GFAP GNB2 HNRNPA2B1 HSPA8 LMNA NECAP1 NEFL PAFAH1B2 PARK7 PDIA6 PSME1 PURA SEPT3 SEPT5 SH3GL2 SUCLA2 TAGLN2 TPM2 TUBB2A UCHL1 UQCRC1 VDAC1	Transzport APOE ATP5B ATP5H ATP6V1E1 GUK1 NDUFV2 NECAP1 UQCRC1 VDAC1
	Szénhidrát metabolizmus ENO1 GAPDH MDH1 SUCLA2 TPI1
	Motor protein MYL1 MYH1 TAGLN2 TPM2
	Stressz válasz HSPA8 PARK7 STIP1 UCHL1
Nukleotid kötés ACTA2 ATP5B GUK1 HNRNPA2B1 HNRNPH2 HSPA8 MYH1 SEPT3 SEPT5 TUBB2A TUBB2C TUBB3	Lipid metabolizmus APOE ATP5B IAH1 PAFAH1B2
	Glykolízis ENO1 GAPDH MDH1 TPI1
	Neuron differenciáció TUBB2A TUBB3
Transzkripció/Transzláció/Nukleotid metabolizmus ENO1 HNRNPA2B1 HNRNPH2 HSPA8 GUK1	Axonnövekedés szabályzása APOE DPYSL2
	Transzkripciós faktor kötés ENO1 PURA
	Szeptin komplex képzés

PURA	SEPT3
Idegrendszeri fejlődés	SEPT5
DPYSL2	Protein hajtogatás
INA	DNAJB11
NDUFV2	HSPA8
PURA	PDIA6
Szignál transzdukció	Oxidatív stressz válasz
DPYSL2	HNRNPA2B1
GNB2	HNRNPH2
SH3GL2	PARK7
TUBB3	Trikarboxi sav ciklus
mRNS feldolgozás	MDH1
HNRNPA2B1	SUCLA2
HNRNPH2	

3. táblázat: A megtalált fehérjék csoportosítása ismert funkcióik szerint – néhány fehérje több helyen is szerepel.

A fehérjék mennyiségi változásai a génexpresszió regulációjának változására utalnak. Ezért a modellezés következő lépésében közös expressziós regulátorokat kerestünk. A 16 mért kortikális fehérjéből 8 olyat találtunk, melynek közös expressziós regulátora van. Ezek közé tartozik a GFAP, GAPDH és az NEFL, melyeket mind a kéregből, mind pedig a thalamusból kimutattunk. Ezeknek sorrendben 26, 31, illetve 5 helyi kapcsolata volt ebben a hálózatban. A HSPA8 és a triózfoszfát izomeráz 1 (TPI1) 5-5 kapcsolattal bírt, míg a proteaszóma aktivátor 1-es alegység (PSME1), heterogén nukleáris ribonukleoprotein A2/B1 (HNRNPA2B1) és az ubiquitinol-cytrókrom c redukáz 1-es magprotein (UQCRC1) sorrendben 3, 2, 1 kapcsolattal rendelkeztek (19. ábra).

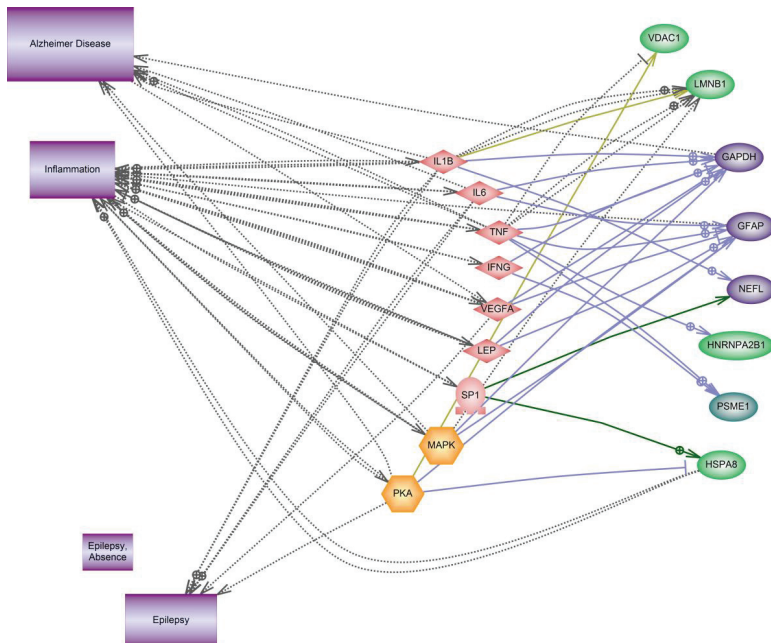


19. ábra: A kéregből mért proteinek közös expressziós regulátorainak hálózata. Zöld: A kéregből mért proteinek. Lila: A kéregből és thalamusból is kimutatott proteinek. Piros: Újonnan behozott entitások: transzkripciós faktorok, növekedési faktorok és immunológiailag releváns entitások (IL1B, IL4, IL6, CSF2, TNF, IFNG). Sárga hexagon: funkcionális csoportok (NF-kB, TNF).

A kiterjesztett hálózat 35 új taggal bővült, melyek közé több transzkripciós faktor és növekedési faktor tartozott, de immunológiailag releváns tagokat is találtunk, mint például az NFkB és a tumor nekrosis faktor (TNF) család funkcionális osztály, IL1B, interleukin 4 (IL4), interleukin 6 (IL6), kolónia stimuláló faktor 2 (granulocita-makrofág) (CSF2), interferon gamma (IFNG) (19. ábra). Meglepő módon a hálózat a nem-szelektív kation csatorna funkciók osztályt is magába foglalta, melyek a GAPDH-hoz és a TPII-hez kapcsolódtak.

Következő lépésként egy betegség típusú entitást, a gyulladást adtuk a hálózatunkhoz, és megnéztük, hogyan kapcsolódik. A gyulladásnak 62 helyi kapcsolata volt, 53 befelé mutató (csúcsba érkező) és 9 kifelé mutató (csúcsból kiinduló). Ezt a 9 kapcsolatot tartottuk meg a gyulladástól a 9 közös közös expressziós regulátorhoz (IL1B, IL6, TNF, IFNG, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A (VEGFA), leptin

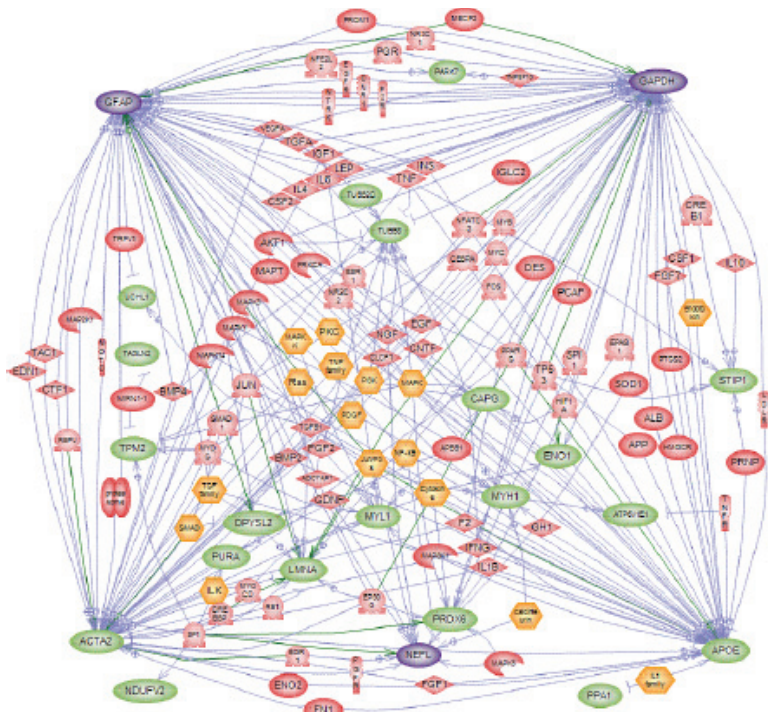
(LEP), Sp1 transzkripciósi faktor (SP1), valamint MAPK és protein kináz A (PKA) funkcionális osztály), és töröltük a hátramaradt felé mutató kapcsolt, illetve nem kapcsolt entitásokat (20. ábra). Az eredményként kapott korlátozott hálózat a kortikális proteinjeinkből a következőket tartalmazta: GFAP, GAPDH, NEFL, HNRNPA2B1, PSME1, HSPA8. Amikor e hálózat és a kapcsolattal nem rendelkező fehérjék viszonyát vizsgáltuk, a VDAC1 és a lamin B1 (LMNB1) hozzáadódott hálózatunkhoz. Végül megvizsgáltuk a korlátozott hálózat és további betegség típusú entitás, epilepszia és abszensz epilepszia, valamint az Alzheimer-kór viszonyát és 6 regulátoros kapcsolatot fedeztünk fel a köztes expresszió szabályzó entitások felől az epilepszia felé (IL1B, IL6, TNF, IFNG, VEGFA és LEP). Az Alzheimer kórral 8 regulátoros kapcsolatot találtunk (20. ábra).



20. ábra: Kilenc gyulladásos folyamatokhoz köthető közös expressziós regulátor entitás, és azok kapcsolata 8, a kéregben mért proteinünkkel (VDAC1, LMNB1, GFAP, GAPDH, NEFL, HNRNPA2B1, PSME1 és HSPA8) és az Alzheimer-kórral.

A thalamuszban a közös expressziós szabályozók hálózata sokkal összetettebb volt. A 35 mért thalamikus proteinből 23-nak volt közös expressziós regulátora. Ezek közé tartozott a korábbiakból már ismert GFAP, GAPDH és NEFL, melyek mind a kéregben, mind pedig a thalamuszban változást mutattak, és a thalamikus hálózat esetében sorrendben 54, 52 illetve 11 helyi kapcsolattal rendelkeztek. Egyéb, viszonylag kiterjedt kapcsolatokkal rendelkező fehérjék voltak: aktin alfa 2 (ACTA2), APOE, 47 illetve 41 kapcsolattal, míg a lamin-A (LMNA) és a béta tubulin 3 (TUBB3) 12-12 kapcsolattal, a PRDX6 9 kapcsolattal rendelkeztek (21. ábra).

Ez a thalamikus közös expressziós szabályzó hálózat 107 új, transzkripciós faktorok, növekedési faktorok és immunológiai releváns molekulák közé tartozó entitást hozott be (21. ábra). Az immunológiai releváns entitások, azok mellett, melyek a kérgi hálózatban is jelen voltak (NFkB és TNF család funkcionális osztály, IL1B, IL4, IL6, TNF, IFNG és CSF2), tartalmazták az interleukin 1 (IL1) családot, citokin és endotoxin funkcionális osztályt (LPS!), interleukin 10 (IL10), tumor nekrosis faktor receptor szupercsalád 1b tagja (TNFRSF1B) és a kolónia stimuláló faktor 1 (makrofág) (CSF1) entitásokat.



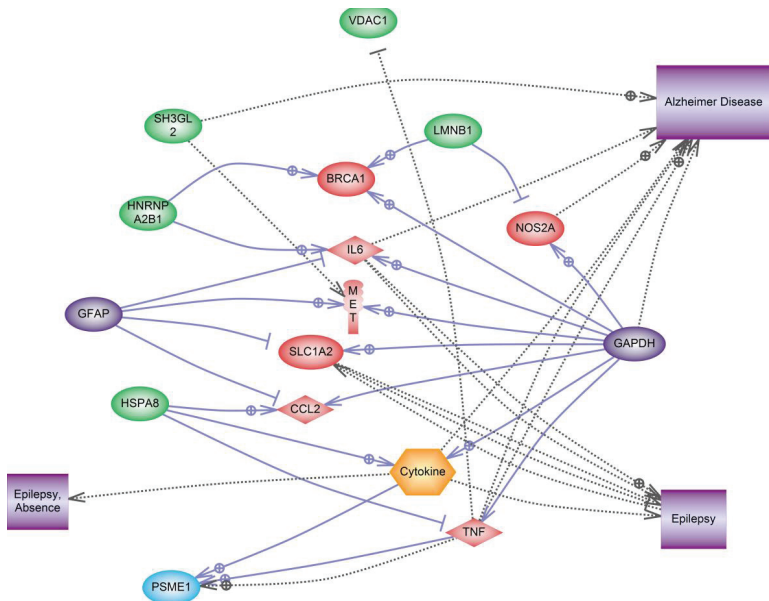
21. ábra: A thalamuszból mért proteinek közös expressziós regulátorainak hálózata. Zöld: a thalamuszból mért proteinek. Lila: A thalamuszból és a kéregből is kimutatott proteinek. Piros: Újonnan behozott entitások: proteinek, transzkripciós faktorok, növekedési faktorok és immunológiailag releváns entitások (IL1B, IL4, IL6, CSF2, TNF, IFNG). Sárga hexagon: funkcionális csoportok (NFkB, TNF).

Ehhez a thalamikus közös expressziós szabályzó hálózathoz szintén hozzárendeltük a gyulladást, mint betegség típusú új entitást, és megvizsgáltuk a kapcsolatokat. A gyulladásnak 161 helyi kapcsolata volt, 149 befelé mutató és 12 kifelé mutató. Ezt a 12 kapcsolatot tartottuk meg a gyulladástól a 12 köztes általános expressziós regulátor entitáshoz, melyek javarészt átfedtek a kérgiekkel (proszttaglandin-endoperoxid szintáz 2/ciklooxygenáz 2 (PTGS2/COX2), IL1B, IL6, TNF, IFNG, VEGFA, LEP, SP1 transzkripciós faktor és MAPK, IL1 család, citokin funkcionális osztály), és töröltük a befelé mutatóan kapcsolt illetve nem kapcsolódó entitást (22.

ábra). Ez a csökkentett thalamikus közös expressziós regulátor hálózat 15 thalamuszban mért proteinünket kapcsolt össze: GAPDH, GFAP, NEFL, stressz indukált foszfoprotein 1 (STIP1), APOE, ACTA2, PURA, LMNA, NDUFV2, TUBB3, tropomiozin béta lánc (TPM2), capping protein (actin filament), gelszolin szerű aktin szabályzó protein (CAPG), ENO1, szervesen pirofoszfátáz (PPA1), PRDX6 és UCHL1. Amikor kapcsolatot kerestünk ezen thalamikus hálózat és a kapcsolattal nem rendelkező mért proteinjeink között, a miozin, nehéz lánc 1 (MYH1), V-típusú proton ATPáz E1 alegység (ATP6V1E1), alfa-internexin (INA), és a TUBB2C hozzáadódtak hálózatunkhoz. Végül megvizsgáltuk ezen hálózat, és az epilepszia, abszensz epilepszia valamint Alzheimer-kór betegség típusú entitások kapcsolatát, és 7 regulátoros kapcsolatot találtunk az epilepszia felé öt köztes expressziós regulátor entitás felől (PTGS2, IL1B, IL6, VEGFA és Cytokine), és 4 kapcsolatot az APOE, NDUFV2 és SEPT3 felől (22. ábra). Az Alzheimer-kórral ez a hálózat 14 kapcsolatot mutatott. Az abszensz epilepsziának csak egy kapcsolata volt a citokin funkcionális csoporttal, érdekességképpen ez a kapcsolat egy a laboratóriumunkban készült előző munkán alapult, mely az LPS SWD-facilitáló hatásáról szólt WAG/Rij patkányokon [154].

kór (korai kezdetű autoszómális recesszív) 7 protein (PARK7), célmolekuláiként szerepeltek.

A közös expressziós regulátorokon kívül megvizsgáltuk, hogy megváltozott expressziójú proteinjeink milyen közös expressziós célpontokkal rendelkeznek. A kortikális közös expressziós célmolekulák hálózata a mért proteinek közül 5 proteint tartalmazott, melyeknek közös expressziós célmolekulái voltak (23. ábra). A hálózat 8 új entitást hozott be, melyek mindegyike a GAPDH expressziós célmolekulája volt. Az entitások közé tartozott három fehérje: nitrogén-oxid szintáz 2A (NOS2A), amely egy LPS és bizonyos citokinek által indukálható protein; 1-es típusú mellrák fogékonysági protein (BRCA1,) egy nukleáris foszfoprotein, amely a genomiális stabilitás fenntartásában játszik szerepet, tumorszupresszor funkciója van, és a BRCA1 asszociált genom ellenőrző komplex (BASC) nevű nagy, sokalegységes komplex részét képezi; valamint egy szállítómolekula, az oldott anyag szállító 1 család (gliális nagyaffinitású glutamát transzporter) 2-es számú tagja (SLC1A2), egy membránköttöt fehérje, amelynek feladata, hogy fő transzporterként a glutaminsav excitatórikus neurotranszmittert távolítja el az extracelluláris térből a szinapszisok környezetében. A beiktatott entitások körébe szintén beletartozott a citokin funkcionális osztály; IL6; és a kemokin (C-C motívum) L2-es ligandum (CCL2), ami erős korrelációra utal az NFkB és TNF szignalizáció aktivációjával. A nyolcadik entitás, amely bekerült a hálózatba a met proto-onkogén (MET) volt, amely a GADPH és GFAP célmolekulájaként szerepelt. A GAPDH és GFAP egyéb általános célpontjai az IL6, SLC1A2 és CCL2 voltak, de ezeket a GFAP negatívan befolyásolta. A HNRNPA2B1 pozitívan befolyásolhatja mind az IL6, mind pedig a BRCA1 termelődését, míg az LMNB1 serkentette a BRCA1, és csökkentette a NOS2A képződését. Végül, de nem utolsó sorban a HSPA8 serkentette mind a CCL2, mind pedig a citokin funkcionális osztály termelését, és csökkentette a TNF képződést (23. ábra).



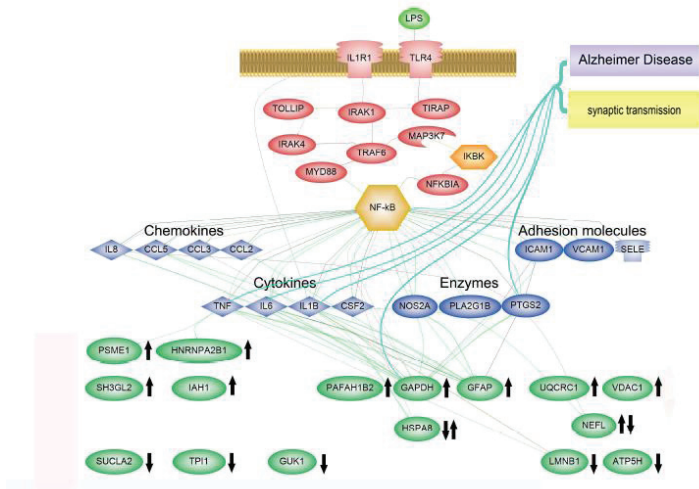
23. ábra: A kéregben mért proteinjeink közös expressziós célmolekuláinak hálózata.

Azt is megvizsgáltuk, hogy vajon az egyéb kéregben mért, eddig még nem kapcsolódó proteinek rendelkeznek-e valamilyen kapcsolattal ehhez a kérgi közös expressziós célmolekula hálózathoz. Eredményeink szerint az SH3-alegységtartalmú GRB2-szerű fehérje 2 (SH3GL2) pozitívan befolyásolhatta a MET képződést, és a TNF negatívan befolyásolhatta a VDAC1 expresszióját, valamint mind a TNF, mind pedig a citokinek serkenethették a PSME1 expresszióját.

Végül megvizsgáltuk, hogy az epilepsziának, abszensz epilepsziának és Alzheimer-kórnak milyen kapcsolata van a kortikális közös expressziós célmolekula hálózatunkhoz. Az abszensz epilepsziának egyetlen kapcsolata volt a citokin funkcionális osztályon keresztül [154], míg az epilepszia az IL6-ot és az SLC1A2-t is sokszoros kapcsolattal befolyásolta (23. ábra). Az Alzheimer-kór entitással 7 kapcsolatot fedeztünk fel.

A thalamuszban mért fehérjékből összeállított közös expressziós célmolekula hálózat összetettebb volt. A 35 megváltozott fehérjéből 16-nak volt általános expressziós célpontja (24. ábra). A kéreg fehérjehálózatához hasonlóan a GAPDH-nak és GFAP-nek sok célmolekulája volt (sorrendben 31 és 10), de a kizárólag thalamuszban mért fehérjéknek szintén számos célpontja volt, például: APOE 33; MYH1 13; PURA (puringazdag elemet kötő protein A), és LMNA 9-9 célmolekulával rendelkeztek. Ez a hálózat 59 új entitást hozott be, melyek közül 7 a kérgi hálózattal közös entitás volt (IL-6, TNF, NOS2A, CCL2, MET, SLC1A2 és a citokin funkcionális osztály) (24. ábra). Az 52 kizárólag thalamikus hálózati entitás a jónéhány transzkripciós faktoron és növekedési faktoron kívül számos immunológiailag releváns entitást is magába foglalt, például: a LEF funkcionális osztály (limfoid serkentő faktorok, T-sejt faktorok); FAS (TNF receptor szupercsalád tagja); IL10 (interleukin 10); az immunoglobulin komplex; IFNG (interferon gamma); NOS3 (nitrogén oxid szintáz 3), és az intercelluláris adhéziós molekula 1 (ICAM1).

Végezetül mind a kéreg (25. ábra), mind pedig a thalamusz (26. ábra) esetében megvizsgáltuk, hogy a kísérleteinkben kimutatott proteinek milyen kapcsolatban állnak az Alzheimer-kórral illetve a szinaptikus transzmisszió regulációjával, és melyik az a legrövidebb hálózat, amelyben e két entitás közös protein változásaival áll kapcsolatban. Jól látható, hogy mindkét jelenség kiterjedt kapcsolatrendszerrel rendelkezik az NFκB szignalizációs útvonallal. A cortexben az Alzheimer-kór 11 kapcsolaton, a szinaptikus transzmisszió szintén 11 kapcsolaton keresztül köthető az NFκB útvonalhoz. Ebből 6 közös kapcsolódási pont fedezhető fel (IL6, PTGS2, IL1B, TNF, NFκB, GAPDH) (25. ábra).



25. ábra: A kéregben mért proteineink kapcsolata az Alzheimer-kórral és szinaptikus folyamatokkal. Az Alzheimer-kór neuroimmunológiai folyamatai, valamint a WAG/Rij patkányokban, LPS indukált proteomikai változások az NFκB szignalizációs útvonalon konvergálnak. Az NFκB útvonal aktivációja a szinaptikus folyamatok megváltozásához vezet, amely egy lehetséges magyarázata lehet az LPS indukálta gyulladás abszensz epilepsziát serkentő hatásának, valamint az Alzheimer-kórban szenvedők nem konvulzív epilepsziájának is.

V. Megvitatás

A kísérleti eredmények megvitatását két alapvető szempont szerint végezzük el. Az egyik, hogy az egyes kísérleti blokkok eredményeit külön tekintjük át, hiszen tematikusan elég távol álló területekről van szó. Másrészt a kísérletek eredményei által generált és továbbkutatható problémákra koncentrálnunk. A megbeszélés végén egy általános konklúzió levonására is kísérletet teszünk.

V.1. A különböző aggregáltsági összetételű amyloid oldatok akut hatása a populációs tüzelésre

Bemutattuk, hogy a különböző aggregációs összetételű amyloid oldatok az aggregátumok méreteloszlásának függvényében a pSpike amplitúdójának növekedését illetve csökkenését okozhatják. Az oldatösszetétel biokémiai, biofizikai vizsgálata bebizonyította, hogy sikerrel állítottunk elő reprodukálható összetételű oldatokat a mérések céljára. Az oldatok sztenderdizálása során végül egyetlen paramétert, az oldatok inkubálásának, azaz a felhasználás előtt szobahőn eltöltött idő hosszát változtattuk. Az így kapott oldatok aggregátumai méretükben és morfológiájukban különböztek, fiziológiai hatásaik különbözők és jól körülírhatók voltak.

Az altatott és szabadonmozgó állatokon végzett kísérletek eredményeit összevetve levonhatjuk a következtetést, hogy az uretán csökkentette a vizsgált oldatok szignifikáns hatását. Emiatt a maszkírozó hatás miatt javasoljuk az uretán használatának kerülését az amyloid oligomerek elektrofiziológiai hatásának vizsgálata során illetve kiemeljük az altatásban kapott eredmények szabadonmozgó állaton történő bemutatásának fontosságát.

Kapott eredményeink új megvilágításba helyezik a korábbi ellentmondásos irodalmi adatokat. Korábban bizonyítást nyert, hogy az amyloid oligomerek a hosszútávú potenciációt (LTP) gátolják [64, 190-195]. Másfelől ezen kutatások előtt

pontosan az ellenkezőjét, az LTP serkentését írták le [118, 119], valamint nemrégiben Puzzo és munkatársai az amyloid monomerek és oligomerek pikomoláris koncentrációban történő alkalmazása során az LTP jelentős növekedéséről számoltak be [196]. Shankar és munkatársai a humán β -amyloid szolubilis, alacsony tagszámú oligomereinek hatásaként a szinapszisok számának csökkenését írták le [197]. Az említett művek közül egyikben sem beszélnek a szerzők a felhasznált oldatok fizikai-kémiai karakterizálásáról. Adataink tanúsága szerint az ellentmondásos eredmények mögött rejlő molekuláris mechanizmusok feltárhatók, ha a felhasznált oldatok oligomerizációs profilját, aggregátum összetételét pontosabban figyelembe vesszük. A különböző β -amyloid aggregátumok jelen tanulmányban bemutatott ellentétes hatásai eltérő célmolekulákra utalnak, de ezen molekulák kilétéről egyelőre nincs információnk. A tény az, hogy az A β oldatokban minden aggregációs fokhoz egy oligomer eloszlás tartozik, ami jellemző az adott oldatra. Így a hatás tekintetében is csak ezt az eloszlásfüggvényt lehet megadni és nem egy konkrét oligomert.

A feltételezhető célmolekulák kereséséhez számos irodalom segítséget nyújthat. Ismert, hogy a protofibrilláris szerkezetű β -amyloid preferáltan kötődik az NMDA receptorcsaládhoz, míg a nagyméretű, fibrilláris amyloid formák szelektíven modulálják a nem-NMDA receptorok működését [115, 198]. Valóban, az NMDA és nem-NMDA receptorok létező célmolekulák, de nem zárható ki egyéb molekuláris célpontok létezése sem [40], ami tovább árnyalja a lehetséges patomechanizmusról alkotott képet.

A kísérleteink során alkalmazott különböző aggregátumok csupán a pSpike amplitúdóját befolyásolták, a pEPSP meredeksége változatlan maradt. Ebből arra következtethetünk, hogy a legkorábbi támadáspontok ezen aggregátumok esetén a sejtek akciós potenciál generáló helyei lehetnek. Eredményeink nem támasztják alá azt az elképzelést, miszerint a kis és diffúzibilis oligomerek gyorsan bejuthatnak a szinapszisokba, hiszen ebben az esetben a szinaptikus potenciálok megváltozása lenne a legkorábbi tapasztalható elváltozás. Felvetődik tehát olyan kísérletek tervezése a jövőben, melyekben a kis oligomerek celluláris támadáspontjait általánosabb értelemben vizsgálná meg, ugyanis nem evidens, hogy ez csupán a szinapszis.

Hippokampális szemcse sejteken végzett egész sejt patch-clamp mérések feltárták, hogy a β -amyloid oligomerek csökkentik a neuronális excitabilitást [199]. Ezt

a jelenséget a dendritikus excitabilitás NMDA-receptor függő növekedésével [200], és a gyorsan inaktíválódó kálium áram (I_A) gátlásával magyarázták [112].

Ramsden és munkatársai az aggregáltatott és aggregálatlan amyloid K^+ csatornák áramaira gyakorolt különböző hatásait írták le [201].

Adataink alapján feltételezhetjük, hogy az oligomerek potenciális célpontjai között szerepelhetnek az axonok iniciális szegmensei, hiszen az ugyanazon szinaptikus bemenet hatására létrejövő akcióspotenciál genezis növekedett illetve csökkent. A kísérleteink során szerzett ismeretek nem zárják ki a β -amyloid oligomerek hosszú távon jelentkező szinaptikus moduláló hatását, így tehát alátámasztják azt a korábbi megfigyeléseken alapuló elképzelést, miszerint mind a szinaptikus, mind pedig a hálózati tulajdonságok elváltozásai fontos szerepet játszanak az Alzheimer-kór kialakulásában [45, 202]. Azonban felvetik a kérdést, hogy az akciós potenciál genezis helyek is preferált célterületek lehetnek.

Az elhangzottakat összefoglalva elmondhatjuk, hogy a β -amyloid oligomerek hatásainak vizsgálata során elengedhetetlenül fontos a felhasznált oldatok aggregációs állapotának lehető legpontosabb mérése. Munkánk eredményei rávilágítanak, hogy a különböző oligomerek különböző elektrofiziológiai hatással rendelkeznek, ami az oligomerizáció fokától függ.

V.2. Kórosan megnövekedett tónusos GABA_A gátlás az abszensz epileptogenezis hátterében

Bemutattuk, hogy az extraszinaptikus GABA_A receptorok (eGABA_AR) túlműködése egy általános molekuláris mechanizmus a különféle genetikai és farmakológiai abszensz modellekben. Mindemellett a korábbi vizsgálatokkal megegyezően alig tapasztaltunk változást a fázisos (szinaptikus) GABA_A gátlás folyamatában.

Ezen kívül kísérleti eredményeink bemutatják, hogy a túlzott tónikus gátlás elegendő feltétele a rohamgenezisnek, és némely modell esetén szükséges feltétele a rohamok megjelenésének. Korábbi tanulmányok felvetették az eGABA_AR-ok és a GAT-1 transzporter szerepét a konvulzív rohamok genézisében. Eredményeink tanúsága szerint szerepük közvetlen bizonyítást nyert az abszensz epileptogenezis folyamatában. Továbbá a GAT-1 KO egerek és az intrathalamikus NO711 kezelés új genetikai illetve farmakológiai abszensz epilepszia modellek lehetnek. A GAERS patkányok, lethargic és stargazer egerek megnövekedett tónikus gátlása mögött a GAT-1 hibás működése áll, de az, hogy milyen genetikai variánsok vezetnek a funkciózavarhoz ezekben a modellekben egyelőre ismeretlen. A GAT-1 különböző intracelluláris modulációs folyamatok célpontja [203-206], a thalamuszban viszont a GABA felvételt kizárólag asztrociák végzik [207]. Így tehát a thalamikus sejtszintű patológia feltehetően az asztrocitákhoz köthető.

Össességében elmondhatjuk, hogy adataink bizonyossága szerint az eGABA_AR-ok túlműködése számos abszensz modell esetében kulcslépés a patomechanizmusban. Továbbá, a thalamikus GAT-1 központi szerepet játszik az abszensz rohamok megjelenésében. Így tehát a thalamikus eGABA_AR-ok és GABA transzporterek potenciális terápiás célpontok lehetnek az abszensz epilepszia gyógyításában.

Számos tanulmány számol be arról, hogy a kortikális területeken kívül szubkortikálisan, így a thalamuszban is kimutatható az A β felhalmozódása Alzheimer-kórban szenvedők agyában, és transzgenikus modellállatokban is [208-210], amely a kített területek anyagcseréjének zavarában is megmutatkozik [211]. Az asztrociták

aktivációja mára már szintén elfogadott része az Alzheimer-kór patomechanizmusának (összefoglaló: [212]).

Nem zárható ki tehát, hogy a thalamuszban zajló, A β felhalmozódás által okozott patológias sejtbológiai folyamatok hozzájárulnak a serkentés-gátlás egyensúlyának megbomlásához a neuronális hálózatok szintjén, ami epileptoid aktivitáshoz, abszensz jellegű nem konvulzív generalizált rohamok megjelenéséhez is vezethet. Mindezek alapján fontosnak látszik a A β akkumuláció thalamikus szintű vizsgálata.

V.3. Az Alzheimer-kór patomechanizmusának neuroimmunológiai folyamatai is facilitálják az abszensz epilepszia megjelenését

Számos akut mérés mutatja be, hogy a különböző β -amyloid aggregátumok miként befolyásolják a neuronális excitabilitást (ld. VI.1). A β -amyloid jelenléte a szövetben ezen kívül olyan neuroimmunológiai folyamatokat is elindíthat, melyek tovább modulálják a neuronális kommunikációt. *In silico* modellezési eredményeink (melyek különböző kísérleti eredmények összehasonlításán alapulnak) azt mutatják, hogy számos közös elemet tartalmaz az Alzheimer-kór illetve az LPS abszensz epilepsziát serkentő hatásának hátterében álló fehérje-hálózat. Tudjuk továbbá, hogy az Alzheimer-kór későbbi szakaszában β -amyloid oligomereket mutattak ki a thalamuszban is. Az Alzheimer-kór patomechanizmusa mind a kérgi, mind pedig a thalamikus protein hálózatok esetén immunkompetens fehérjéken keresztül köthető az excitabilitás megváltozásához, epileptogén neuroimmunológiai kölcsönhatásokhoz. Az LPS kezelés által befolyásolt fehérjék közül a cortex esetében a validált irodalmi adatok szerint az IL1B, NF-kB, NOS2A, TNF, PTGS2, IL6, SH3GL2, GAPDH, IL1R1, PLA2G1B fehérjék, a thalamusz esetében pedig az APOE, IL1B, NF-kB, NOS2A, TNF, PTGS2, IL6, DPYSL2, GAPDH, ILR1, PLA2G1B fehérjék hozhatók kapcsolatba az Alzheimer-kór patomechanizmusával. Mindkét struktúra esetében kimutatható, hogy a fent említett fehérjék közül az IL6, PTGS2, IL1B, TNF, NF-kB, GAPDH részt vesznek a szinaptikus áttevődés folyamatainak regulációjában.

A közös neuroimmunológiai lépések számos, az Alzheimer-kór neuroimmunológiai hátterével foglalkozó cikkben is fellelhetők (összefoglaló: [213]).

V.4. Általános konklúziók

Kísérleti adataink alapján egyértelműen igazoltnak látszik, hogy a β -amyloid aggregációja során folyamatosan változó oligomer eloszlás funkcionálisan eltérő hatású eloszlásokat vesz fel. A korai aggregátumok excitatórikus a későbbiek inhibítoros hatást válthatnak ki. Ez valószínűleg attól függ, hogy az adott oligomer eloszlásban dominánsan jelenlévő hatékony oligomernek mi a célpontja. A pSpike-ra kifejtett hatás szerint ez lehet az akciós potenciál generátor hely is.

A β -amyloid oligomerek egyik, jövőben vizsgálandó célpontja az abszensz epilepsziás rohamokat generáló thalamo-kortikális rendszer, ahol a GABA receptorok is lehetnek célpontok.

Az abszensz epilepszia gyakoriságára ható gyulladásos mechanizmus is potenciális célpontja lehet az $A\beta$ -nak. Erre utal a gyulladás által módosított expressziójú fehérjék és az Alzheimer-kórban ismert szerepű fehérjék jelentős átfedése a thalamo-kortikális rendszerben. Adataink alapján mind a celluláris lokalizáció szempontjából, mind az agyi lokalizáció szempontjából fontos új $A\beta$ célpontokat lehet kijelölni a jövőben a thalamo-kortikális rendszerben. A disszertációban összefoglalt eredmények megnyitották az utat a felsorolt új irányokba.

VI. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Kékesi Adrienna Katalinnak és Juhász Gábor Professzornak, akik odaadó munkával és mély szakmai tudásukkal utat mutattak munkám során.

Köszönet illeti Vincenzo Crunelli és Giuseppe Di Giovanni Professzor Urakat, akikkel Cardiffban töltött éveim alatt együtt dolgozhattam.

Továbbá köszönet illeti Dr. Kardos Józsefet, akivel a β -amyloid oldatok karakterizálásán dolgoztunk, és Völgyi Katalint aki szakdolgozó hallgatóként segítségemre volt a β -amyloid oldatok elektrofiziológiai hatásának felderítésében.

Cikkünk megírásában adott segítségéért és a kísérletek során adott szakmai tanácsokért köszönettel tartozom Dr. Czurkó Andrásnak.

Köszönet az ELTE-TTK Proteomikai Laboratórium és a Cardiffi Egyetem Idegtudományi Kutatócsoportja hallgatóinak és dolgozóinak.

Végül, de nem utolsó sorban köszönet illeti családtagjaimat, akik mind anyagi mind lelki támogatást nyújtottak doktori tanulmányaim során.

Nélkülük ez a dolgozat nem születhetett volna meg.

VII. Irodalomjegyzék

1. Love, S., *Neuropathology - A reference text of CNS pathology*. 2000, London: Harcourt Publisher Limited.
2. Plassman, B.L., et al., *Prevalence of dementia in the United States: the aging, demographics, and memory study*. *Neuroepidemiology*, 2007. **29**(1-2): p. 125-32.
3. Larner, A.J., *Epileptic seizures in AD patients*. *Neuromolecular Med*, 2010. **12**(1): p. 71-7.
4. Tariska, P., *Alzheimer-kór*. 2000, Budapest: Golden Book Kiadó.
5. Klunk, W.E. and D.J. Abraham, *Filamentous proteins in Alzheimer's disease: new insights through molecular biology*. *Psychiatr Dev*, 1988. **6**(2): p. 121-52.
6. Wood, J.G., et al., *Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(11): p. 4040-3.
7. Joachim, C.L., et al., *Tau epitopes are incorporated into a range of lesions in Alzheimer's disease*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1987. **46**(6): p. 611-22.
8. Cole, G.M., et al., *Accumulation of amyloid precursor fragment in Alzheimer plaques*. *Neurobiol Aging*, 1991. **12**(2): p. 85-91.
9. Cras, P., et al., *Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(17): p. 7552-6.
10. Perry, G., et al., *Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(9): p. 3033-6.
11. Terry, R.D., *The Fine Structure of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1963. **22**: p. 629-42.
12. Wisniewski, H.M., H.K. Narang, and R.D. Terry, *Neurofibrillary tangles of paired helical filaments*. *J Neurol Sci*, 1976. **27**(2): p. 173-81.
13. Wisniewski, H.M., P.A. Merz, and K. Iqbal, *Ultrastructure of paired helical filaments of Alzheimer's neurofibrillary tangle*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1984. **43**(6): p. 643-56.
14. McKee, A.C., K.S. Kosik, and N.W. Kowall, *Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease*. *Ann Neurol*, 1991. **30**(2): p. 156-65.
15. Perry, G., et al., *Neuropil threads of Alzheimer's disease show a marked alteration of the normal cytoskeleton*. *J Neurosci*, 1991. **11**(6): p. 1748-55.
16. Schmidt, M.L., J.M. Murray, and J.Q. Trojanowski, *Continuity of neuropil threads with tangle-bearing and tangle-free neurons in Alzheimer disease cortex. A confocal laser scanning microscopy study*. *Mol Chem Neuropathol*, 1993. **18**(3): p. 299-312.
17. del Ser, T., et al., *Vascular dementia. A clinicopathological study*. *J Neurol Sci*, 1990. **96**(1): p. 1-17.
18. Gomez-Ramos, P., E.J. Mufson, and M.A. Moran, *Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in neurofibrillary tangles, neuropil threads and senile plaques in aged and Alzheimer's brain*. *Brain Res*, 1992. **569**(2): p. 229-37.

19. Yamaguchi, H., et al., *Ultrastructure of the neuropil threads in the Alzheimer brain: their dendritic origin and accumulation in the senile plaques*. Acta Neuropathol, 1990. **80**(4): p. 368-74.
20. Scheuner, D., et al., *Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease*. Nat Med, 1996. **2**(8): p. 864-70.
21. Lee, S.C., et al., *Inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in the Alzheimer disease hippocampus: association with Hirano bodies, neurofibrillary tangles, and senile plaques*. J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(11): p. 1163-9.
22. Wolfe, M.S., et al., *Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity*. Nature, 1999. **398**(6727): p. 513-7.
23. Levy-Lahad, E., et al., *Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus*. Science, 1995. **269**(5226): p. 973-7.
24. Rogaev, E.I., et al., *Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene*. Nature, 1995. **376**(6543): p. 775-8.
25. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 741-66.
26. Heese, K. and H. Akatsu, *Alzheimer's disease--an interactive perspective*. Curr Alzheimer Res, 2006. **3**(2): p. 109-21.
27. Nandi, P.K., *Protein conformation and disease*. Vet Res, 1996. **27**(4-5): p. 373-82.
28. DeMager, P.P., et al., *Pathological peptide folding in Alzheimer's disease and other conformational disorders*. Curr Med Chem, 2002. **9**(19): p. 1763-80.
29. Stine, W.B., Jr., et al., *In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis*. J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 11612-22.
30. Finder, V.H. and R. Glockshuber, *Amyloid-beta aggregation*. Neurodegener Dis, 2007. **4**(1): p. 13-27.
31. Frieden, C., *Protein aggregation processes: In search of the mechanism*. Protein Sci, 2007. **16**(11): p. 2334-44.
32. Hussain, I., et al., *Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase*. Mol Cell Neurosci, 1999. **14**(6): p. 419-27.
33. Sinha, S. and I. Lieberburg, *Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11049-53.
34. Vassar, R., et al., *Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE*. Science, 1999. **286**(5440): p. 735-41.
35. Nixon, R.A., *Niemann-Pick Type C disease and Alzheimer's disease: the APP-endosome connection fattens up*. Am J Pathol, 2004. **164**(3): p. 757-61.
36. Pasternak, S.H., J.W. Callahan, and D.J. Mahuran, *The role of the endosomal/lysosomal system in amyloid-beta production and the pathophysiology of Alzheimer's disease: reexamining the spatial paradox from a lysosomal perspective*. J Alzheimers Dis, 2004. **6**(1): p. 53-65.

37. Rajendran, L., et al., *Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(30): p. 11172-7.
38. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **120**(3): p. 885-90.
39. Masters, C.L., et al., *Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(12): p. 4245-9.
40. Verdier, Y. and B. Penke, *Binding sites of amyloid beta-peptide in cell plasma membrane and implications for Alzheimer's disease*. Curr Protein Pept Sci, 2004. **5**(1): p. 19-31.
41. Glenner, G.G., et al., *The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis*. Appl Pathol, 1984. **2**(6): p. 357-69.
42. Gula, C., et al., *Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity*. Nat Med, 1998. **4**(7): p. 827-31.
43. Lorenzo, A. and B.A. Yankner, *Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 12243-7.
44. Pike, C.J., et al., *In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity*. Brain Res, 1991. **563**(1-2): p. 311-4.
45. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease is a synaptic failure*. Science, 2002. **298**(5594): p. 789-91.
46. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. Science, 2002. **297**(5580): p. 353-6.
47. Orban, G., et al., *Different electrophysiological actions of 24- and 72-hour aggregated amyloid-beta oligomers on hippocampal field population spike in both anesthetized and awake rats*. Brain Res, 2010. **1354**: p. 227-35.
48. Soreghan, B., J. Kosmoski, and C. Glabe, *Surfactant properties of Alzheimer's A beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation*. J Biol Chem, 1994. **269**(46): p. 28551-4.
49. Harper, J.D., C.M. Lieber, and P.T. Lansbury, Jr., *Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-beta protein*. Chem Biol, 1997. **4**(12): p. 951-9.
50. Lambert, M.P., et al., *Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6448-53.
51. Funato, H., et al., *Presence of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid beta-protein dimers in the hippocampus CA1 not exhibiting neurofibrillary tangle formation*. Am J Pathol, 1999. **155**(1): p. 23-8.
52. Klein, W.L., G.A. Krafft, and C.E. Finch, *Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?* Trends Neurosci, 2001. **24**(4): p. 219-24.
53. Knopman, D.S., et al., *Neuropathology of cognitively normal elderly*. J Neuropathol Exp Neurol, 2003. **62**(11): p. 1087-95.
54. McLean, C.A., et al., *Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 1999. **46**(6): p. 860-6.

55. Dahlgren, K.N., et al., *Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 32046-53.
56. Kirkitadze, M.D., G. Bitan, and D.B. Teplow, *Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies*. J Neurosci Res, 2002. **69**(5): p. 567-77.
57. Walsh, D.M., et al., *Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(4): p. 552-7.
58. Stephan, A. and A.G. Phillips, *A case for a non-transgenic animal model of Alzheimer's disease*. Genes Brain Behav, 2005. **4**(3): p. 157-72.
59. Klein, W.L., W.B. Stine, Jr., and D.B. Teplow, *Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2004. **25**(5): p. 569-80.
60. Lacor, P.N., et al., *Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers*. J Neurosci, 2004. **24**(45): p. 10191-200.
61. Walsh, D.M. and D.J. Selkoe, *Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration*. Protein Pept Lett, 2004. **11**(3): p. 213-28.
62. Cleary, J.P., et al., *Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function*. Nat Neurosci, 2005. **8**(1): p. 79-84.
63. Haass, C. and D.J. Selkoe, *Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(2): p. 101-12.
64. Walsh, D.M., et al., *Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potentially inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 535-9.
65. Coleman, P.D. and P.J. Yao, *Synaptic slaughter in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(8): p. 1023-7.
66. Bertoni-Freddari, C., et al., *Deterioration threshold of synaptic morphology in aging and senile dementia of Alzheimer's type*. Anal Quant Cytol Histol, 1996. **18**(3): p. 209-13.
67. Urbanc, B., et al., *Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid deposits in transgenic mice and Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 13990-5.
68. Moechars, D., et al., *Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6483-92.
69. Walsh, D.M. and D.J. Selkoe, *Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease*. Neuron, 2004. **44**(1): p. 181-93.
70. Walsh, D.M. and D.J. Selkoe, *A beta oligomers - a decade of discovery*. J Neurochem, 2007. **101**(5): p. 1172-84.
71. Gotz, J., et al., *Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform*. Embo J, 1995. **14**(7): p. 1304-13.
72. Santacruz, K., et al., *Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function*. Science, 2005. **309**(5733): p. 476-81.
73. Gotz, J. and L.M. Ittner, *Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(7): p. 532-44.

74. Roberson, E.D., et al., *Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model*. Science, 2007. **316**(5825): p. 750-4.
75. Gotz, J., et al., *Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils*. Science, 2001. **293**(5534): p. 1491-5.
76. Lewis, J., et al., *Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP*. Science, 2001. **293**(5534): p. 1487-91.
77. Bolmont, T., et al., *Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta-containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice*. Am J Pathol, 2007. **171**(6): p. 2012-20.
78. Terwel, D., et al., *Amyloid activates GSK-3 β to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice*. Am J Pathol, 2008. **172**(3): p. 786-98.
79. Phiel, C.J., et al., *GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 435-9.
80. Oddo, S., et al., *Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction*. Neuron, 2003. **39**(3): p. 409-21.
81. Holcomb, L., et al., *Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes*. Nat Med, 1998. **4**(1): p. 97-100.
82. Schmitz, C., et al., *Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. Am J Pathol, 2004. **164**(4): p. 1495-502.
83. Wang, R., et al., *Wild-type presenilin 1 protects against Alzheimer disease mutation-induced amyloid pathology*. J Biol Chem, 2006. **281**(22): p. 15330-6.
84. Postina, R., et al., *A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model*. J Clin Invest, 2004. **113**(10): p. 1456-64.
85. Bales, K.R., et al., *Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition*. Nat Genet, 1997. **17**(3): p. 263-4.
86. Dodart, J.C., et al., *Gene delivery of human apolipoprotein E alters brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(4): p. 1211-6.
87. Hirokawa, N. and R. Takemura, *Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(3): p. 201-14.
88. Higuchi, M., et al., *Axonal degeneration induced by targeted expression of mutant human tau in oligodendrocytes of transgenic mice that model glial tauopathies*. J Neurosci, 2005. **25**(41): p. 9434-43.
89. Ishihara, T., et al., *Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform*. Neuron, 1999. **24**(3): p. 751-62.
90. Stokin, G.B., et al., *Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Science, 2005. **307**(5713): p. 1282-8.
91. Kamal, A., et al., *Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I*. Neuron, 2000. **28**(2): p. 449-59.

92. Kamal, A., et al., *Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP*. Nature, 2001. **414**(6864): p. 643-8.
93. Dixit, R., et al., *Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau*. Science, 2008. **319**(5866): p. 1086-9.
94. Goedert, M. and M.G. Spillantini, *A century of Alzheimer's disease*. Science, 2006. **314**(5800): p. 777-81.
95. Magnani, E., et al., *Interaction of tau protein with the dynactin complex*. Embo J, 2007. **26**(21): p. 4546-54.
96. Abbott, A., *Doctors seek lost data on Alzheimer's vaccine*. Nature, 2004. **430**(7001): p. 715.
97. Liu, L., et al., *A transgenic rat that develops Alzheimer's disease-like amyloid pathology, deficits in synaptic plasticity and cognitive impairment*. Neurobiol Dis, 2008. **31**(1): p. 46-57.
98. Ruiz-Opazo, N., et al., *Attenuated hippocampus-dependent learning and memory decline in transgenic TgAPPswe Fischer-344 rats*. Mol Med, 2004. **10**(1-6): p. 36-44.
99. Echeverria, V., et al., *Rat transgenic models with a phenotype of intracellular Abeta accumulation in hippocampus and cortex*. J Alzheimers Dis, 2004. **6**(3): p. 209-19.
100. Folkesson, R., et al., *A transgenic rat expressing human APP with the Swedish Alzheimer's disease mutation*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(3): p. 777-82.
101. Frautschy, S.A., G.M. Cole, and A. Baird, *Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid*. Am J Pathol, 1992. **140**(6): p. 1389-99.
102. Guenette, S.Y., *Mechanisms of Abeta clearance and catabolism*. Neuromolecular Med, 2003. **4**(3): p. 147-60.
103. Flood, J.F., J.E. Morley, and E. Roberts, *Amnesic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid beta protein from patients with Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3363-6.
104. McDonald, M.P., et al., *Effects of an exogenous beta-amyloid peptide on retention for spatial learning*. Behav Neural Biol, 1994. **62**(1): p. 60-7.
105. Maurice, T., B.P. Lockhart, and A. Privat, *Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction*. Brain Res, 1996. **706**(2): p. 181-93.
106. Debiec, J., J.E. LeDoux, and K. Nader, *Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus*. Neuron, 2002. **36**(3): p. 527-38.
107. Milekic, M.H. and C.M. Alberini, *Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation*. Neuron, 2002. **36**(3): p. 521-5.
108. Delobette, S., A. Privat, and T. Maurice, *In vitro aggregation facilitates beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia in the rat*. Eur J Pharmacol, 1997. **319**(1): p. 1-4.
109. O'Hare, E., et al., *Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated A beta (1-42)*. Brain Res, 1999. **815**(1): p. 1-10.

110. Nakamura, S., et al., *Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide*. Brain Res, 2001. **912**(2): p. 128-36.
111. Engstrom, I., et al., *Alzheimer amyloid beta-peptides exhibit ionophore-like properties in human erythrocytes*. Eur J Clin Invest, 1995. **25**(7): p. 471-6.
112. Good, T.A. and R.M. Murphy, *Effect of beta-amyloid block of the fast-inactivating K⁺ channel on intracellular Ca²⁺ and excitability in a modeled neuron*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15130-5.
113. Ueda, K., et al., *Amyloid beta protein potentiates Ca²⁺ influx through L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels: a possible involvement of free radicals*. J Neurochem, 1997. **68**(1): p. 265-71.
114. Ekinci, F.J., K.U. Malik, and T.B. Shea, *Activation of the L voltage-sensitive calcium channel by mitogen-activated protein (MAP) kinase following exposure of neuronal cells to beta-amyloid. MAP kinase mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30322-7.
115. Ye, C., et al., *Amyloid beta-protein induced electrophysiological changes are dependent on aggregation state: N-methyl-D-aspartate (NMDA) versus non-NMDA receptor/channel activation*. Neurosci Lett, 2004. **366**(3): p. 320-5.
116. Itoh, A., et al., *Impairments of long-term potentiation in hippocampal slices of beta-amyloid-infused rats*. Eur J Pharmacol, 1999. **382**(3): p. 167-75.
117. Sun, M.K. and D.L. Alkon, *Impairment of hippocampal CA1 heterosynaptic transformation and spatial memory by beta-amyloid(25-35)*. J Neurophysiol, 2002. **87**(5): p. 2441-9.
118. Wu, J., R. Anwyl, and M.J. Rowan, *beta-Amyloid selectively augments NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus*. Neuroreport, 1995. **6**(17): p. 2409-13.
119. Wu, J., R. Anwyl, and M.J. Rowan, *beta-Amyloid-(1-40) increases long-term potentiation in rat hippocampus in vitro*. Eur J Pharmacol, 1995. **284**(3): p. R1-3.
120. Lesne, S., et al., *A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory*. Nature, 2006. **440**(7082): p. 352-7.
121. Andersen, P., T.V. Bliss, and K.K. Skrede, *Unit analysis of hippocampal population spikes*. Exp Brain Res, 1971. **13**(2): p. 208-21.
122. Crunelli, V. and N. Leresche, *Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(5): p. 371-82.
123. Bessaih, T., et al., *Nucleus-specific abnormalities of GABAergic synaptic transmission in a genetic model of absence seizures*. J Neurophysiol, 2006. **96**(6): p. 3074-81.
124. McCormick, D.A. and D. Contreras, *On the cellular and network bases of epileptic seizures*. Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 815-46.
125. Blumenfeld, H., *Consciousness and epilepsy: why are patients with absence seizures absent?* Prog Brain Res, 2005. **150**: p. 271-86.
126. von Krosigk, M., T. Bal, and D.A. McCormick, *Cellular mechanisms of a synchronized oscillation in the thalamus*. Science, 1993. **261**(5119): p. 361-4.
127. Huntsman, M.M., et al., *Reciprocal inhibitory connections and network synchrony in the mammalian thalamus*. Science, 1999. **283**(5401): p. 541-3.

128. Wallace, R.H., et al., *Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures*. Nat Genet, 2001. **28**(1): p. 49-52.
129. Kananura, C., et al., *A splice-site mutation in GABRG2 associated with childhood absence epilepsy and febrile convulsions*. Arch Neurol, 2002. **59**(7): p. 1137-41.
130. Maljevic, S., et al., *A mutation in the GABA(A) receptor alpha(1)-subunit is associated with absence epilepsy*. Ann Neurol, 2006. **59**(6): p. 983-7.
131. Macdonald, R.L., et al., *GABA(A) receptor epilepsy mutations*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(8): p. 1497-506.
132. Caddick, S.J., et al., *Excitatory but not inhibitory synaptic transmission is reduced in lethargic (Cacnb4(lh)) and tottering (Cacna1atg) mouse thalami*. J Neurophysiol, 1999. **81**(5): p. 2066-74.
133. Tan, H.O., et al., *Reduced cortical inhibition in a mouse model of familial childhood absence epilepsy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(44): p. 17536-41.
134. Hosford, D.A. and Y. Wang, *Utility of the lethargic (lh/lh) mouse model of absence seizures in predicting the effects of lamotrigine, vigabatrin, tiagabine, gabapentin, and topiramate against human absence seizures*. Epilepsia, 1997. **38**(4): p. 408-14.
135. Hosford, D.A., Y. Wang, and Z. Cao, *Differential effects mediated by GABAA receptors in thalamic nuclei in lh/lh model of absence seizures*. Epilepsy Res, 1997. **27**(1): p. 55-65.
136. Danober, L., et al., *Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat*. Prog Neurobiol, 1998. **55**(1): p. 27-57.
137. Perucca, E., et al., *Antiepileptic drugs as a cause of worsening seizures*. Epilepsia, 1998. **39**(1): p. 5-17.
138. Ettinger, A.B., et al., *Two cases of nonconvulsive status epilepticus in association with tiagabine therapy*. Epilepsia, 1999. **40**(8): p. 1159-62.
139. Farrant, M. and Z. Nusser, *Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(3): p. 215-29.
140. Glykys, J. and I. Mody, *The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus*. J Physiol, 2007. **582**(Pt 3): p. 1163-78.
141. Cope, D.W., S.W. Hughes, and V. Crunelli, *GABAA receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons*. J Neurosci, 2005. **25**(50): p. 11553-63.
142. Belelli, D., et al., *Extrasynaptic GABAA receptors of thalamocortical neurons: a molecular target for hypnotics*. J Neurosci, 2005. **25**(50): p. 11513-20.
143. Jia, F., et al., *An extrasynaptic GABAA receptor mediates tonic inhibition in thalamic VB neurons*. J Neurophysiol, 2005. **94**(6): p. 4491-501.
144. Bright, D.P., M.I. Aller, and S.G. Brickley, *Synaptic release generates a tonic GABA(A) receptor-mediated conductance that modulates burst precision in thalamic relay neurons*. J Neurosci, 2007. **27**(10): p. 2560-9.
145. Cope, D.W., et al., *Enhanced tonic GABAA inhibition in typical absence epilepsy*. Nat Med, 2009. **15**(12): p. 1392-8.
146. Hauser, W.A., et al., *Seizures and myoclonus in patients with Alzheimer's disease*. Neurology, 1986. **36**(9): p. 1226-30.
147. Mendez, M.F., et al., *Seizures in Alzheimer's disease: clinicopathologic study*. J Geriatr Psychiatry Neurol, 1994. **7**(4): p. 230-3.

148. Hesdorffer, D.C., et al., *Dementia and adult-onset unprovoked seizures*. Neurology, 1996. **46**(3): p. 727-30.
149. Amatniek, J.C., et al., *Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease*. Epilepsia, 2006. **47**(5): p. 867-72.
150. Lozsadi, D.A. and A.J. Larner, *Prevalence and causes of seizures at the time of diagnosis of probable Alzheimer's disease*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2006. **22**(2): p. 121-4.
151. Palop, J.J., et al., *Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease*. Neuron, 2007. **55**(5): p. 697-711.
152. Minkeviciene, R., et al., *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3453-62.
153. Elenkov, I.J., et al., *The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(4): p. 595-638.
154. Kovacs, Z., et al., *Facilitation of spike-wave discharge activity by lipopolysaccharides in Wistar Albino Glaxo/Rijswijk rats*. Neuroscience, 2006. **140**(2): p. 731-42.
155. Wang, J., T. Ando, and A.J. Dunn, *Effect of homologous interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha on the core body temperature of mice*. Neuroimmunomodulation, 1997. **4**(5-6): p. 230-6.
156. Hulkkonen, J., et al., *The balance of inhibitory and excitatory cytokines is differently regulated in vivo and in vitro among therapy resistant epilepsy patients*. Epilepsy Res, 2004. **59**(2-3): p. 199-205.
157. Simon, N.M., et al., *A detailed examination of cytokine abnormalities in Major Depressive Disorder*. Eur Neuropsychopharmacol, 2008. **18**(3): p. 230-3.
158. Maccioni, R.B., et al., *The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1153**: p. 240-6.
159. Morales, I., G. Farias, and R.B. Maccioni, *Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Neuroimmunomodulation, 2010. **17**(3): p. 202-4.
160. Godbout, J.P., et al., *Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system*. Faseb J, 2005. **19**(10): p. 1329-31.
161. Krueger, J.M., *Muramyl peptide enhancement of slow-wave sleep*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1986. **8**(2): p. 105-10.
162. van Luijtelaar, E.L. and A.M. Coenen, *Two types of electrocortical paroxysms in an inbred strain of rats*. Neurosci Lett, 1986. **70**(3): p. 393-7.
163. Coenen, A.M. and E.L. Van Luijtelaar, *Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats*. Behav Genet, 2003. **33**(6): p. 635-55.
164. Lorton, D., et al., *Bidirectional communication between the brain and the immune system: implications for physiological sleep and disorders with disrupted sleep*. Neuroimmunomodulation, 2006. **13**(5-6): p. 357-74.
165. Opp, M.R., *Cytokines and sleep*. Sleep Med Rev, 2005. **9**(5): p. 355-64.
166. Shandra, A.A., et al., *The role of TNF-alpha in amygdala kindled rats*. Neurosci Res, 2002. **42**(2): p. 147-53.

167. Galic, M.A., et al., *Postnatal inflammation increases seizure susceptibility in adult rats*. J Neurosci, 2008. **28**(27): p. 6904-13.
168. Vezzani, A., *Innate immunity and inflammation in temporal lobe epilepsy: new emphasis on the role of complement activation*. Epilepsy Curr, 2008. **8**(3): p. 75-7.
169. Sinha, S., et al., *Do cytokines have any role in epilepsy?* Epilepsy Res, 2008. **82**(2-3): p. 171-6.
170. Mlodzikowska-Albrecht, J., B. Steinborn, and M. Zarowski, *Cytokines, epilepsy and epileptic drugs--is there a mutual influence?* Pharmacol Rep, 2007. **59**(2): p. 129-38.
171. Vezzani, A., et al., *Glia as a source of cytokines: implications for neuronal excitability and survival*. Epilepsia, 2008. **49 Suppl 2**: p. 24-32.
172. Laflamme, N. and S. Rivest, *Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components*. FASEB J, 2001. **15**(1): p. 155-163.
173. Li, C., et al., *Expression of toll-like receptors 2 and 4 and CD14 during differentiation of HL-60 cells induced by phorbol 12-myristate 13-acetate and 1 alpha, 25-dihydroxy-vitamin D(3)*. Cell Growth Differ, 2002. **13**(1): p. 27-38.
174. Singh, A.K. and Y. Jiang, *How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats?* Toxicology, 2004. **201**(1-3): p. 197-207.
175. Beutler, B., *Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling*. Nature, 2004. **430**(6996): p. 257-63.
176. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(6): p. 280-8.
177. Kuno, K. and K. Matsushima, *The IL-1 receptor signaling pathway*. J Leukoc Biol, 1994. **56**(5): p. 542-7.
178. Suffczynski, P., S. Kalitzin, and F.H. Lopes Da Silva, *Dynamics of non-convulsive epileptic phenomena modeled by a bistable neuronal network*. Neuroscience, 2004. **126**(2): p. 467-84.
179. Tian, G., et al., *Thermodynamics of beta-amyloid fibril formation*. J Chem Phys, 2004. **120**(17): p. 8307-17.
180. Zarandi, M., et al., *Synthesis of Abeta[1-42] and its derivatives with improved efficiency*. J Pept Sci, 2007. **13**(2): p. 94-9.
181. Naiki, H. and F. Gejyo, *Kinetic analysis of amyloid fibril formation*. Methods Enzymol, 1999. **309**: p. 305-18.
182. Paxinos, G. and C. Watson, *The Rat Brainin Stereotaxic Coordinates*. Third Edition ed. 1997, San Diego: Academic Press.
183. Riedel, G., T. Seidenbecher, and K.G. Reymann, *LTP in hippocampal CA1 of urethane-narcotized rats requires stronger tetanization parameters*. Physiol Behav, 1994. **55**(6): p. 1141-6.
184. Maguire, J.L., et al., *Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety*. Nat Neurosci, 2005. **8**(6): p. 797-804.
185. Alban, A., et al., *A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard*. Proteomics, 2003. **3**(1): p. 36-44.

186. Tonge, R., et al., *Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology*. Proteomics, 2001. **1**(3): p. 377-96.
187. Shevchenko, A., et al., *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2856-60.
188. Naiki, H., et al., *Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1*. Anal Biochem, 1989. **177**(2): p. 244-9.
189. Naiki, H. and K. Nakakuki, *First-order kinetic model of Alzheimer's beta-amyloid fibril extension in vitro*. Lab Invest, 1996. **74**(2): p. 374-83.
190. Rowan, M.J., et al., *Synaptic plasticity in animal models of early Alzheimer's disease*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2003. **358**(1432): p. 821-8.
191. Townsend, M., et al., *Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers*. J Physiol, 2006. **572**(Pt 2): p. 477-92.
192. Klyubin, I., et al., *Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization*. J Neurosci, 2008. **28**(16): p. 4231-7.
193. Rowan, M.J., et al., *Mechanisms of the inhibitory effects of amyloid beta-protein on synaptic plasticity*. Exp Gerontol, 2004. **39**(11-12): p. 1661-7.
194. Shankar, G.M., et al., *Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory*. Nat Med, 2008. **14**(8): p. 837-42.
195. Chang, E.H., et al., *AMPA receptor downscaling at the onset of Alzheimer's disease pathology in double knockin mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3410-5.
196. Puzzo, D., et al., *Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus*. J Neurosci, 2008. **28**(53): p. 14537-45.
197. Shankar, G.M., et al., *Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway*. J Neurosci, 2007. **27**(11): p. 2866-75.
198. Tanzi, R.E., *The synaptic Abeta hypothesis of Alzheimer disease*. Nat Neurosci, 2005. **8**(8): p. 977-9.
199. Yun, S.H., et al., *Amyloid-beta1-42 reduces neuronal excitability in mouse dentate gyrus*. Neurosci Lett, 2006. **403**(1-2): p. 162-5.
200. Frick, A., J. Magee, and D. Johnston, *LTP is accompanied by an enhanced local excitability of pyramidal neuron dendrites*. Nat Neurosci, 2004. **7**(2): p. 126-35.
201. Ramsden, M., et al., *Differential effects of unaggregated and aggregated amyloid beta protein (1-40) on K(+) channel currents in primary cultures of rat cerebellar granule and cortical neurones*. J Neurochem, 2001. **79**(3): p. 699-712.
202. Hardy, J., *Testing times for the "amyloid cascade hypothesis"*. Neurobiol Aging, 2002. **23**(6): p. 1073-4.
203. Quick, M.W., et al., *Second messengers, trafficking-related proteins, and amino acid residues that contribute to the functional regulation of the rat brain GABA transporter GAT1*. J Neurosci, 1997. **17**(9): p. 2967-79.

204. Beckman, M.L., E.M. Bernstein, and M.W. Quick, *Multiple G protein-coupled receptors initiate protein kinase C redistribution of GABA transporters in hippocampal neurons*. J Neurosci, 1999. **19**(11): p. RC9.
205. Wang, D., et al., *Syntaxin 1A inhibits GABA flux, efflux, and exchange mediated by the rat brain GABA transporter GAT1*. Mol Pharmacol, 2003. **64**(4): p. 905-13.
206. Hu, J. and M.W. Quick, *Substrate-mediated regulation of gamma-aminobutyric acid transporter 1 in rat brain*. Neuropharmacology, 2008. **54**(2): p. 309-18.
207. De Biasi, S., L. Vitellaro-Zuccarello, and N.C. Brecha, *Immunoreactivity for the GABA transporter-1 and GABA transporter-3 is restricted to astrocytes in the rat thalamus. A light and electron-microscopic immunolocalization*. Neuroscience, 1998. **83**(3): p. 815-28.
208. Mosconi, L., et al., *Increased fibrillar amyloid- β burden in normal individuals with a family history of late-onset Alzheimer's*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(13): p. 5949-54.
209. Ronnback, A., et al., *Progressive neuropathology and cognitive decline in a single Arctic APP transgenic mouse model*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(2): p. 280-92.
210. Ronnback, A., et al., *Amyloid neuropathology in the single Arctic APP transgenic model affects interconnected brain regions*. Neurobiol Aging, 2012. **33**(4): p. 831 e11-9.
211. Woo, D.C., et al., *Regional metabolic alteration of Alzheimer's disease in mouse brain expressing mutant human APP-PS1 by IH HR-MAS*. Behav Brain Res, 2010. **211**(1): p. 125-31.
212. Li, C., et al., *Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease*. Curr Alzheimer Res, 2011. **8**(1): p. 67-80.
213. Kapadia, M. and B. Sakic, *Autoimmune and inflammatory mechanisms of CNS damage*. Prog Neurobiol, 2011. **95**(3): p. 301-33.

VII. Rövidítésjegyzék

2D-DIGE: két-dimenziós differenciál gél elektroforézis
ACTA2: aktin alfa 2
ACSF: artificial cerebro-spinal fluid, mesterséges cerebro-spinális folyadék
ADAM10: a disintegrin and metalloproteinase 10
ADAMS: Aging, Demographics, and Memory Study
ADDL: A β -derived diffusible ligand
AFM: atomi erő mikroszkópia
AKT1: thyoma virális proto-onkogén 1
aODN: antiszensz oligo-deoxi-nukleotid
ApoE: apolipoprotein E
APOE: Apolipoprotein E
APP: amyloid prekursor protein
ATP5B: ATP szintáz béta alegység
ATP5H: ATP szintáz d alegység
ATP6V1E1: V-típusú proton ATPáz E alegység 1
ATP6V1E1: V-típusú proton ATPáz E1 alegység
A β : β -amyloid
BACE: β -site APP-cleaving enzyme
BASC: BRCA1 asszociált genom ellenőrző komplex
BRCA1: 1-es típusú mellrák fogékonysági protein
CA1: cornu ammonis-1
CAPG: capping protein (actin filament), gelszolin szerű aktin szabályzó protein
CCL2: kemokin (C-C motívum) L2-es ligandum
CSF1: kolónia stimuláló faktor 1 (makrofág)
CSF2: kolónia stimuláló faktor 2
DYPSL2: dihidropirimidáz-szerű fehérje 2
EEG: elektro enkefalogram
eGABA_AR: extraszinaptikus A típusú γ -amino vajsav receptor
EM: elektronmikroszkóp

ENO1: Alfa-enoláz
 ETX: etho-szuximid
 fEPSP: field excitatoric post synaptic potencial, mező excitatórikus poszt-szinaptikus potenciál
 GABA: γ -amino vajsav
 GABA_AR: A típusú γ -amino vajsav receptor
 GABA_AR δ : δ alegység tartalmú GABA_A receptor
 GAERS: Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg
 GAPDH: glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
 GAT-1: 1-es típusú GABA transzporter
 GFAP: gliális fibrilláris savas fehérje
 GNB2: guanin nukleotid guanin nukleotid kötő protein G(I)/G(S)/G(T) béta-2 alegység
 GSK3 β : glikogén szintáz kináz 3 β
 HNRNPA2B1: heterogén nukleáris ribonukleoprotein A2/B1
 HSPA8: 70 kDa hősokk protein 8
 ICAM1: intercelluláris adhéziós molekula 1
 IFNG: interferon gamma
 IL1: interleukin 1
 IL10: interleukin 10
 IL1B: interleukin 1 β
 IL1R: az interleukin 1 receptor
 IL4: interleukin 4
 IL6: interleukin 6
 INA: alfa-internexin
 IPSC: inhibitory post synaptic current, gátló poszt-szinaptikus áram
 Klc: kinezine light chain
 Klc^{+/-}: kinezin könnyű lánc heterozigóta
 LEP: leptin
 LMNA: lamin-A
 LMNB1: lamin B1
 LPS: lipopoliszacharid

LTP: long term potentiation, hosszútávú potenciáció
 MAPK: mitogén aktiválta protein kináz
 MDH1: maleát dehidrogenáz
 MET: met proto-onkogén
 mODN: miszszensz oligo-deoxi-nukleotid
 MYH1: miozin nehéz lánc 1
 NDUFV2: NADH dehidrogenáz [ubiquinon] flavoprotein 2
 NECAP1: adaptin fül-kötő köpeny-asszociált fehérje 1
 NEFL: könnyű neurofilament polipeptid
 NFkB: nuclear factor-kappa B, kappa B nukleáris faktor
 NFT: neurofibrilláris köteg
 NMDA: N-metil-D-aszpartát
 NO-711: 1-(2-(((diphenylmethylene)amino)oxy)ethyl)-1,2,5,6-tetrahydro-3-pyridinecarboxylic acid
 NOS2A: nitrogén-oxid szintáz 2A
 PARK7: Parkinson-kór (korai kezdetű autoszómális recesszív) 7 protein
 pEPSP: populációs excitatórikus poszt-szinaptikus potenciál
 PHF-tau: páros helikális filamentális tau
 PKA: protein kináz A
 PPA1: szervesen pirofoszfátáz
 PRDX6: Peroxiredoxin-6
 PS1: preszenilin-1
 PS2: preszenilin-2
 PSME1: proteaszóma aktivátor 1-es alegység
 pSpike: populációs tüske
 PTGS2/COX2: prosztaglandin-endoperoxid szintáz 2/ciklooxygenáz 2
 PURA: Pur-alfa transzkripció aktivátor protein, puringazdag elemet kötő protein A
 SEPT3: neuron specifikus szeptin-3
 sGABA_AR: szinaptikus A típusú γ -amino vajsav receptor
 SH3GL2: SH3-alegységtartalmú GRB2-szerű fehérje 2
 SLC1A2: oldott anyag szállító 1 család (gliális nagyaffinitású glutamát transzporter)

SP1: Sp1 transzkripció faktor

SPRD: Sprague-Dawley

STIP1: stressz indukált foszfoprotein 1

SWD: spike-and-wave discharge, tüske-hullám kisülés

TC: thalamo-kortikális

THIP: 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-ol

ThT: thioflavin-T

TLR4: Toll-like receptor 4, 4-es típusú Toll-szerű receptor

TNF: tumor nekrosis faktor

TNFRSF11B: tumor nekrosis faktor receptor szupercsalád 11b tagja

TPI1: triózfoszfát izomeráz 1

TPM2: tropomiozin béta lánc

TUBB2A: béta tubulin 2A lánc

TUBB2C: béta tubulin 2C lánc

TUBB3: béta tubulin 3

UCHL1: ubiquitin karboxil-terminális észteráz L1 (ubiquitin tiorészteráz)

UQCRC1: ubiquitinol-cytokrom c redukáz I-es magprotein

VB: a thalamusz ventro-bazális magcsoportja

VDAC1: feszültségfüggő anionszelektív csatorna fehérje 1

VEGFA: vaszkuláris endotheliális növekedési faktor A

WAG/Rij: Wistar Albino Glaxo/Rijswijk

IX. Összefoglalás

Munkánk során bemutattuk, hogy a β -amyloid oligomerek akut kísérletekben az aggregáltsági fokuktól függően csökkenthetik, vagy növelhetik a neuronális excitabilitást. Alzheimer-kóros betegek, és transzgenikus modellállatok esetében egyaránt megjelennek β -amyloid lerakódások a thalamuszban, melyek befolyásolják a neuronális és gliális működést egyaránt. A thalamokortikális sejtek excitabilitásának csökkenése (a mi kísérleteinkben a tónikus GABA_A áram patológiás növekedése miatt) abszensz epilepsziás rohamok megjelenéséhez vezet. Az epileptoid aktivitás a β -amyloid közvetlen hatásán kívül neuroimmunológiai folyamatok eredménye is lehet, tekintettel az LPS epileptogén hatásának, és az Alzheimer-kór neuroimmunológiai folyamatainak közös jelátviteli útjára.

Így tehát további megerősítést nyer az a mára már tényként is kezelt feltételezés, hogy az epilepszia és az Alzheimer-kór összefüggésében nem pusztán ko-incidenciáról, hanem valós ko-morbiditásról beszélhetünk. Feltételezhető, hogy a spontán epileptoid aktivitás hozzájárul Alzheimer-kórosok esetén a kognitív zavarok, és memóriazavarok kialakulásához, megjelenéséhez. Felmerül tehát, hogy adjuváns kezelésként anti-epileptikumok alkalmazása is szükségessé válhat Alzheimer-kóros betegek esetében. Mindamellet, hogy ez a terápiás kiegészítés még mindig nem oki terápia, a betegség tüneti kezelésében jó irány lehet.

A jövőben célszerű lehetne a β -amyloid aggregátumok thalamuszbeli elektrofiziológiai hatásának vizsgálata abszens epilepszia modellállatok (például GAERS és/vagy WAG/Rij patkányokon), valamint a β -amyloid TC sejteken mérhető tónikus gátlást módosító hatásának tisztázása. Ezen kísérletek további információval szolgálhatnak a két betegség patológiájának viszonyáról.

X. Summary

In our current work we presented that oligomeric forms of β -amyloid either decrease or increase neuronal excitability depending on the degree of the aggregation. In patients suffering in Alzheimer's disease, and also in transgenic animal models of the disease β -amyloid deposits can be observed in the thalamus, which influence both neural and glial functions. A decrease of the excitability of thalamo-cortical neurons (in our study due to a pathological increase of the tonic GABA_A current) leads to the appearance of absence epileptic seizures. The epileptoid activity beside the direct effect of β -amyloid, could also be the outcome of neuroimmune processes considering the common intracellular pathway of the pro-epileptogenic effect of peripheral inflammation (mimicked with systemic administration of LPS), and the neuroimmunological processes of the pathomechanism of Alzheimer's disease.

The claim (nowadays also treated as a fact), that the relationship of epilepsy and Alzheimer's disease can be considered a real co-morbidity rather than simple coincidence gained further support. Supposingly, the spontaneous epileptoid activity can also contribute to the appearance and development of cognitive and memory disorders in the case of patients suffering in Alzheimer's disease. This could suggest that as an adjuvant therapy, anti-epileptoid treatment could be feasible in the case of Alzheimer's disease. Beside the fact that this adjuvant therapeutic supplement is still not a causal solution for Alzheimer's diseased people, it can still be a considerable approach in the symptomatic treatment of the illness.

In the future, it would be practical to test the electrophysiological effects of the β -amyloid aggregates in the thalamus of absence epilepsy model animals, such as GAERS or WAG/Rij rats, and also to clarify the possible direct effect of β -amyloid on the tonic inhibition measured on thalamo-cortical cells. These experiments could provide us with further details on the relationship of the pathomechanism of the two illnesses.